

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

|                                                                       |                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(19)【発行国】</b><br>日本国特許庁 ( J P )                                    | <b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b><br>Japan Patent Office(JP)                                                                                        |
| <b>(12)【公報種別】</b><br>公開特許公報 ( A )                                     | <b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b><br>Laid-open Kokai Patent(A)                                                                                     |
| <b>(11)【公開番号】</b><br>特開平 10-257896                                    | <b>(11)[KOKAI NUMBER]</b><br>Unexamined Japanese Patent Heisei<br>10-257896                                                                    |
| <b>(43)【公開日】</b><br>平成 1 0 年 ( 1 9 9 8 ) 9 月 2<br>9 日                 | <b>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]</b><br>September 29, Heisei 10 (1998. 9.29)                                                                 |
| <b>(54)【発明の名称】</b><br>グリコサミノグリカン硫酸基転<br>移酵素のポリペプチド及びそれ<br>をコードするDNA   | <b>(54)[TITLE OF THE INVENTION]</b><br>DNA which codes the polypeptide of the<br>glycosaminoglycan sulfuric-acid group<br>transferases, and it |
| <b>(51)【国際特許分類第 6 版】</b><br>C12N 15/09 ZNA<br>C07H 21/04<br>C12N 9/10 | <b>(51)[IPC INT. CL. 6]</b><br>C12N 15/09 ZNA<br>C07H 21/04<br>C12N 9/10                                                                       |
| //(C12N 15/09 ZNA<br>C12R 1:91 )<br>(C12N 9/10<br>C12R 1:91 )         | //(C12N 15/09 ZNA<br>C12R 1:91 )<br>(C12N 9/10<br>C12R 1:91 )                                                                                  |
| <b>【 F I 】</b><br>C12N 15/00 ZNA A<br>C07H 21/04 B                    | <b>[FI]</b><br>C12N 15/00 ZNA A<br>C07H 21/04 B                                                                                                |

|                                          |                                                                                           |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| C12N 9/10                                | C12N 9/10                                                                                 |
| 【審査請求】 未請求                               | [REQUEST FOR EXAMINATION] No                                                              |
| 【請求項の数】 14                               | [NUMBER OF CLAIMS] 14                                                                     |
| 【出願形態】 O L                               | [FORM OF APPLICATION] Electronic                                                          |
| 【全頁数】 22                                 | [NUMBER OF PAGES] 22                                                                      |
| (21) 【出願番号】<br>特願平 9-146815              | (21)[APPLICATION NUMBER]<br>Japanese Patent Application Heisei 9-146815                   |
| (22) 【出願日】<br>平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 6 月 4 日 | (22)[DATE OF FILING]<br>June 4, Heisei 9 (1997. 6.4)                                      |
| (31) 【優先権主張番号】<br>特願平 9-6522             | (31)[FOREIGN PRIORITY APPLICATION<br>NUMBER]<br>Japanese Patent Application Heisei 9-6522 |
| (32) 【優先日】<br>平 9 ( 1 9 9 7 ) 1 月 1 7 日  | (32)[FOREIGN PRIORITY DATE]<br>January 17, Heisei 9 (1997. 1.17)                          |
| (33) 【優先権主張国】<br>日本 ( J P )              | (33)[COUNTRY OF FOREIGN PRIORITY]<br>(JP)                                                 |
| (71) 【出願人】                               | (71)[PATENTEE/ASSIGNEE]                                                                   |
| 【識別番号】<br>000195524                      | [ID CODE]<br>000195524                                                                    |
| 【氏名又は名称】<br>生化学工業株式会社                    | [NAME OR APPELLATION]<br>Seikagaku incorporated company                                   |
| 【住所又は居所】                                 | [ADDRESS OR DOMICILE]                                                                     |

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

小林 政

[NAME OR APPELLATION]

Kobayashi Masa

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

羽渕 弘子

[NAME OR APPELLATION]

Hanebuchi Hiroko

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

木全 弘治

[NAME OR APPELLATION]

Kimata Hiroji

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

遠山 勉 (外2名)

[NAME OR APPELLATION]

Toyama Tsutomu (and 2 others)

(57) 【要約】

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

【課題】

[SUBJECT OF THE INVENTION]

ヘパラン硫酸に含まれるＬ－イズロン酸残基の２位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸２－Ｏ－硫酸基転移酵素（HS 2 ST）をコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

**【解決手段】**

チャイニーズハムスターの卵巣細胞からHS 2 STを部分精製してその部分的アミノ酸配列を決定し、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより上記細胞から調製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAからHS 2 ST部分的cDNAを増幅し、得られたcDNA断片をプローブとするハイブリダイゼーションによりcDNAライブラリーからHS 2 ST完全長cDNAを得た。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 14 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるＬ－イズロン酸残基の２位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない１つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵

Heparan-sulfate 2-O- which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in a heparan sulfate alternatively Sulfuric-acid group transferases (HS2ST) It provides DNA which has the base sequence to code.

**【PROBLEM TO BE SOLVED】**

It carried out the partial purification of the HS2ST from the ovarian cells of a Chinese hamster, determined the partial amino acid sequence, amplified poly (A)<sup>+</sup> RNA to HS2 ST-segment-cDNA prepared from the above-mentioned cell by PCR using the oligonucleotide primer made based on the sequence, and obtained the HS2ST perfect length cDNA from the cDNA library by the hybridization which uses the obtained cDNA fragment as a probe.

**【CLAIMS】****【CLAIM 1】**

DNA which has the base sequence which codes at least one part of the polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 14, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of



素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNA。

2-position of L- iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

**【請求項 2】**

配列番号 14 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項 1 記載のDNA。

**[CLAIM 2]**

DNA of Claim 1 which has the base sequence which codes at least one part of the amino acid sequence shown in sequence number 14.

**【請求項 3】**

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNA。

**[CLAIM 3]**

DNA which has the base sequence which codes at least one part of the polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 2, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

**【請求項 4】**

配列番号 2 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項 3 記載のDNA。

**[CLAIM 4]**

DNA of Claim 3 which has the base sequence which codes at least one part of the amino acid sequence shown in sequence number 2.

**【請求項 5】**

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫

**[CLAIM 5]**

DNA which has the base sequence which codes at least one part of the polypeptide of the

酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有する DNA。

**【請求項 6】**

配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号 1 ～ 356 で表されるアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する請求項 5 記載の DNA。

**【請求項 7】**

以下の性質を有するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA。

(1)作用：硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に選択的に転移する。

(2)基質特異性：ヘパラン硫酸および CDSNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸およびケラタン

glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 4, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

**[CLAIM 6]**

DNA of Claim 5 which has the base sequence which codes at least one part of the amino acid sequence expressed with the amino acid number 1-356 in the amino acid sequence shown in sequence number 4.

**[CLAIM 7]**

DNA which has the base sequence which codes the polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which has the following character.

(1) Effect : transfer a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor alternatively from the sulfuric-acid group donor.

(2) Substrate specificity : transfer a sulfuric-acid group to a heparan sulfate and a CDSNS-heparin.

However, it does not transfer a sulfuric-acid group to the chondroitin, a chondroitin sulfate,

硫酸には硫酸基を転移しない。

(3)至適反応pH: pH 5.0～6.5付近

(4)至適反応イオン強度: 50～200 mM付近 (塩化ナトリウムの場合)

(5)阻害及び活性化

プロタミンを共存させることにより酵素活性が増大する。アデノシン-3', 5'-ジリン酸(3', 5'-ADP)を共存させることにより酵素活性が阻害される。10 mM以下のジチオスレイトール(DTT)を共存させることによってほとんど酵素活性に影響を受けない。

(6)分子量: N-グリコシダーゼ処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により推定される分子量: 約38,000。

the dermatan sulfate, and keratan sulfate.

(3) The optimum reaction pH: pH 5.0-6.5 neighborhood

(4) Optimum reaction ionic strength: near 50 to 200 mM (in the case of sodium chloride)

(5) An obstruction and activation

An enzyme activity increases by letting the protamine exist together.

An enzyme activity is obstructed by letting an adenosine- 3',5'- diphosphoric acid (3',5'-ADP) exist together.

Depending on letting a dithiothreitol (DTT) 10 mM or less exist together, it hardly receives influence in an enzyme activity.

(6)

Molecular weight:

Molecular weight presumed by the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in the non-reduction condition after N-glycosidase treatment: About 38,000.

#### 【請求項 8】

チャイニーズハムスター又はヒト由来である請求項 7 記載の DNA。

#### [CLAIM 8]

DNA of Claim 7 which is of a Chinese hamster or human origin.

#### 【請求項 9】

配列番号 14 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミ

#### [CLAIM 9]

Polypeptide which is made up of all or the part of polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 14, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue

ノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

【請求項 10】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

[CLAIM 10]

Polypeptide which is made up of all or the part of polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 2, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

【請求項 11】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分

[CLAIM 11]

Polypeptide which is made up of all or the part of polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the amino acid sequence shown in sequence number 4, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in the

からなるポリペプチド。

glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

**【請求項 12】**

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素。

**[CLAIM 12]**

Glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases containing the polypeptide which may have the amino acid sequence shown in sequence number 4, and may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor from the sulfuric-acid group donor.

**【請求項 13】**

請求項 7 又は 8 記載の DNA が有する塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド。

**[CLAIM 13]**

Polypeptide which is made up of all or the part of polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases coded by the base sequence which DNA of Claim 7 or 8 has.

**【請求項 14】**

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の DNA で形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、該 DNA が有する塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から前記ポリ

**[CLAIM 14]**

It cultures the cell transformed by DNA of any one of Claim 1-8 by a suitable medium, and produce-accumulates in a culture the polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases coded by the base sequence which this DNA has. The manufacturing method including collecting said polypeptide from the culture of the

ペプチドを採取することを含む、ポリペプチドの製造方法。

polypeptide.

**【発明の詳細な説明】**

**[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]**

**【 0 0 0 1 】**

**[0001]**

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（グリコサミノグリカンスルホトランスフェラーゼ）のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有する新規なDNAに関するものである。より詳しくはヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸の2位の水酸基を選択的に硫酸化するチャイニーズハムスター及びヒト由来のヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有するDNAに関するものである。また、本発明は、該DNAを利用するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの製造方法に関するものである。

**[TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION]**

This invention relates to new DNA which has the polypeptide, and the base sequence which codes it of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases (glycosaminoglycan sulfotransferase).

More particularly

It is related with DNA which has polypeptide, and base sequence which codes it of heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases derived from Chinese hamster and human who sulfate alternatively hydroxyl group of 2-position of L- iduronic acid contained in heparan sulfate.

Moreover, this invention relates to manufacturing method using this DNA of polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases.

**【 0 0 0 2 】**

**[0002]**

**【従来の技術】**

ヘパラン硫酸は、ヘキサロン酸（HexA）残基（D-グルクロン酸（GlcA）残基または

**[PRIOR ART]**

Heparan sulfate, let repeating structure  
 (4GlcA(beta)1 / IdoA(alpha)1  
 ->4GlcNAc(alpha)1) of disaccharide of

L-イズロン酸 (IdoA) 残基) と N-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) の二糖の繰り返し構造 ( $4\text{GlcA}\beta 1/ \text{IdoA}\alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\alpha 1$ ) を基本骨格とし、そのヘキスロン酸残基の 2 位の一部および N-アセチルグルコサミン残基の 2 位と 6 位の一部のそれぞれに硫酸基を有するグリコサミノグリカンの一種である。

## 【0003】

グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の遺伝子がクローニングされることにより、硫酸基受容体となるグリコサミノグリカンに対する該酵素の基質特異性についての情報を得ることが可能となり、グリコサミノグリカンの構造と機能の関係を研究する上で有用なアプローチが提供されることが考えられる。グリコサミノグリカンの生合成、その中でもヘパリン/ヘパラン硫酸の生合成には多くの硫酸化のプロセスがあることが知られており (木幡陽、箱守仙一郎、永井克孝編、グリコテクノロジー(5)、57 頁、1994、講談社サイエンティフィック発行)、この硫酸化には様々なグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素が関与しているものと考えられる。ヘパリン/ヘパラン硫酸に硫酸基を転

hexuronic-acid (HexA) residue (D-glucuronic acid (GlcA) residue or L- iduronic-acid (IdoA) residue) and N-acetyl glucosamine residue (GlcNAc) be basic skeleton, a part of 2-position of the hexuronic-acid residue and a part of 2-position,6-position of N-acetyl glucosamine residue, it is 1 type of the glycosaminoglycan which has a sulfuric-acid group in each of these.

## [0003]

By cloning gene of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases, it becomes possible to acquire information about the substrate specificity of this enzyme with respect to glycosaminoglycan used as sulfuric-acid group receptor, and it is thought that useful approach is provided when studying structure of glycosaminoglycan and relation of function.

Biosynthesis of glycosaminoglycan, among these

In biosynthesis of heparin/heparan sulfate, it is known that there exists process of many sulfations.

(Kobata You, Hakomori Senichiro, a Katsutaka Nagai edition, glyco technology (5), 57 pages, 1994, Koudansha-KK scientific issue), it is thought that various glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases is participating in this sulfation.

As glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which transfers a sulfuric-acid group to a heparin/heparan sulfate, the

移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素としては、ヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素（以下、「HS 2 S T」と略記することもある）およびヘパラン硫酸 6-O-硫酸基転移酵素（以下、「HS 6 S T」と略記することもある）が単離されている。しかしながら cDNA のクローニングは困難である。

heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases (it may describe it as "HS2ST" roughly hereafter) and the heparan-sulfate 6-O-sulfuric-acid group transferases (it may describe it as "HS6ST" roughly hereafter) are isolated.

However, the cloning of cDNA is difficult.

#### 【0004】

本発明者らは既に硫酸基供与体である 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸から硫酸基を、硫酸基受容体であるヘパラン硫酸に含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に選択的に転移するヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素をチャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞 (CHO 細胞) から精製している (Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653)。しかしながら、該酵素のクローニングは未だなされていなかった。また、ヒト由来のヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素及びそれをコードする DNA は未だ得られていなかった。

#### [0004]

The present inventors refines the heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in the heparan sulfate which is a sulfuric-acid group receptor alternatively from the 3'-phospho adenosine 5'-phosphosulfate which is already the sulfuric-acid group donor from the cultured cell (CHO cell) derived from the ovary of a Chinese hamster.

(Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653).

However, the cloning of this enzyme was not yet made.

Moreover, DNA which codes the heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases and it derived from a human was not yet obtained.

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課

#### [0005]

[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE



**題】**

ヘパラン硫酸に含まれるＬ－イズロン酸残基の２位の水酸基に硫酸基を選択的に転移する酵素を大量に得ることはヘパラン硫酸の構造解析研究において重要な手段を提供することになるので、当該酵素のｃＤＮＡのクローニングは非常に重要である。すなわち、本発明は当該酵素のポリペプチド及びその配列をコードするｃＤＮＡをクローニングすることにより、当該酵素を簡便な方法により大量に入手する手段を提供し、それにより硫酸化多糖の構造－機能の關係の解明に寄与することを目的とする。

**【０００６】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、ヘパラン硫酸やＮ、Ｏ－脱硫酸化再Ｎ－硫酸化ヘパリン（本明細書中において「ＣＤＳＮＳ－ヘパリン」とも記載する）に含まれるＬ－イズロン酸残基の２位の水酸基に選択的に硫酸基を転移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素、すなわちヘパラン硫酸２－Ｏ－硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードするＤＮＡを鋭意検索し、該酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するｃＤＮＡのクローニングに成功

**INVENTION]**

Obtaining enzyme which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in heparan sulfate alternatively in large quantities provides important means in structure-analysis research of heparan sulfate, therefore, the cloning of cDNA of said enzyme is very important.

That is, by cloning polypeptide of said enzyme, and cDNA which codes the sequence, this invention provides a means by which said enzyme acquires in large quantities by simple method, and aims at this contributing to breakthrough of relation of structure-function of sulfation polysaccharide.

**[0006]****[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

Present inventors do earnest search of DNA which codes polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which alternately transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in heparan sulfate or N and O-desulfurization oxidization re-N-sulfation heparin, i.e., heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases, (It describes it also as "CDSNS-heparin" in this specification)

Succeeded in cloning of cDNA which has base sequence which codes polypeptide of this enzyme, checked that heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases expressed by

し、該 cDNA によりヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素が発現することを確認して本発明を完成した。

**【0007】**

すなわち本発明は、配列番号 14 に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に選択的に転移する酵素活性を実質的に害さない 1 つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入または転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有する DNA を提供する。

**【0008】**

本発明の DNA としては、配列番号 14 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する DNA が挙げられ、より具体的には、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部及び配列番号 4 に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列を有する DNA が挙げられる。

**【0009】**

本発明は、また、以下の性質を有する硫酸基転移酵素のポリペ

this cDNA, and completed this invention.

**[0007]**

That is, this invention provides DNA which has base sequence which codes at least one part of polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have amino acid sequence shown in sequence number 14, and may have substitution of 1 or more amino acid residue which does not injure substantially enzyme activity which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor alternatively from sulfuric-acid group donor, deletion, insertion, or dislocation.

**[0008]**

DNA which has base sequence which codes at least one part of amino acid sequence shown in sequence number 14 as DNA of this invention is mentioned, and DNA which has base sequence which codes at least one part of amino acid sequence shown in at least one part and sequence number 4 of amino acid sequence shown in sequence number 2 more specifically is mentioned.

**[0009]**

This invention provides DNA which has base sequence which also codes polypeptide of

プチドをコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

(1)作用：硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する。

(2)基質特異性：ヘパラン硫酸およびCDSNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸およびケラタン硫酸には硫酸基を転移しない。

(3)至適反応pH：pH5.0～6.5付近

(4)至適反応イオン強度：50～200mM付近（塩化ナトリウムの場合）

(5)阻害及び活性化

プロタミンを共存させることにより酵素活性が増大する。アデノシン-3',5'-ジリン酸(3',5'-ADP)を共存させることにより酵素活性が阻害される。10mM以下のジチオスレイトール(DTT)を共存させることによってほとんど酵素活性に影響を受けない。

(6)分子量：N-グリコシダーゼ処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により推定される分子量：約38,000。

sulfuric-acid group transferases which has the following character.

(1) Effect : transfer sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor alternatively from sulfuric-acid group donor.

(2) Substrate specificity : transfer sulfuric-acid group to heparan sulfate and CDSNS-heparin. However, it does not transfer sulfuric-acid group to chondroitin, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and keratan sulfate.

(3) The optimum reaction pH:pH5.0-6.5 neighborhood

(4) Optimum reaction ionic strength : near 50 to 200 mM (in the case of sodium chloride)

(5) An obstruction and activation

Enzyme activity increases by letting protamine exist together.

Enzyme activity is obstructed by letting adenosine- 3',5'- diphosphoric acid (3',5'-ADP) exist together.

Depending on letting dithiothreitol (DTT) 10 mM or less exist together, it hardly receives influence in enzyme activity.

(6) Molecular weight :

Molecular weight presumed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis in non-reduction condition after N-glycosidase treatment: About 38,000.

【0010】

[0010]

さらに、本発明は、上記DNAの塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドを提供する。

**[0011]**

また、さらに、本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素を提供する。

**[0012]**

尚、本発明のDNAが有する塩基配列がコードするポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（以下「本酵素」とも記載する）を便宜的にヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素またはヘパラン硫酸2-O-スルホトランスフェラーゼと称するが、これは該酵素の基質がヘパラン硫酸に限られることを意味するものではない。例えば本酵素は、N、O-脱硫酸化したヘパリンを再度N-硫酸化することにより得られる化学修飾

Furthermore, this invention provides polypeptide which is made up of all or part of polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases coded by base sequence of above DNA.

**[0011]**

Furthermore, this invention provides glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases including polypeptide which may have amino acid sequence shown in sequence number 4, and may have substitution, deletion, insertion, or dislocation of 1 or more amino acid residue which does not injure substantially enzyme activity which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor from sulfuric-acid group donor.

**[0012]**

In addition, it calls for convenience glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases (it describes it also as "this enzyme" below) including polypeptide which base sequence which DNA of this invention has codes heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases or heparan-sulfate 2-O-sulfotransferase.

However, this does not mean that substrate of this enzyme is restricted to heparan sulfate.

For example

This enzyme, chemical modification heparin obtained by doing N-sulfation again of heparin of which it did N and O- desulfurization

ヘパリン（N，O-脱硫酸化再N-硫酸化ヘパリンであり、本明細書中において「CDSNS-ヘパリン」とも記載する）に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基にも選択的に硫酸基を転移する。また、非修飾のヘパリンは、ほとんどのL-イズロン酸残基の2位に硫酸基を有しているが、わずかに水酸基を有するものがあり、本発明DNAが有する塩基配列がコードする酵素は、このようなヘパリンのL-イズロン酸残基の2位の水酸基にも硫酸基を選択的に転移する。本明細書においてはCDSNS-ヘパリンのような修飾ヘパリンも併せて、単にヘパリンと記載することがある。

**[0013]**

また、本発明は、上記のDNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、該DNAが有する塩基配列によってコードされる本酵素のポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から前記ポリペプチドを採取することを含む、ポリペプチドの製造方法を提供する。

**[0014]****【発明の実施の形態】**

以下に、本発明の実施の形態を

oxidization, (It is N and O- desulfurization oxidization re-N-sulfation heparin.

It describes it also as "CDSNS-heparin" in this specification.)

Transfers sulfuric-acid group also to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in these alternatively.

Moreover, non-modifying heparin has sulfuric-acid group in 2-position of almost all L-s iduronic-acid residue.

However, there exist some which have hydroxyl group slightly.

Enzyme which base sequence which this invention DNA has codes transfers sulfuric-acid group also to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue of such a heparin alternatively.

In this specification, it may also combine modification heparin like CDSNS-heparin, and may only describe it as heparin.

**[0013]**

Moreover, this invention cultures cell transformed by above-mentioned DNA by suitable medium, and produce-accumulates in culture polypeptide of this enzyme coded by base sequence which this DNA has.

It provides manufacturing method including collecting said polypeptide from the culture of polypeptide.

**[0014]****[EMBODIMENT OF THE INVENTION]**

Below, it explains Embodiment of this invention.



説明する。

<1> 本発明のグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA（本発明DNA）  
本発明DNAは配列番号14に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入または転位を有していてもよいグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの少なくとも一部をコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

<1> DNA (this invention DNA) this invention DNA which has base sequence which codes polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases of this invention has amino acid sequence shown in sequence number 14, it provides DNA which has the base sequence which codes at least one part of the polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases which may have the substitution, the deletion, insertion, or dislocation of a 1 or more amino acid residue which does not injure substantially the enzyme activity which transfers a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in the glycosaminoglycan which is a sulfuric-acid group receptor alternatively from the sulfuric-acid group donor.

【0015】

本発明DNAが有する塩基配列によってコードされるポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素は、硫酸基供与体から、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素である。

[0015]

Glycosaminoglycan sulfuric-acid transferases including polypeptide coded by base sequence which this invention DNA has is heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor from sulfuric-acid group donor alternatively.

【0016】

本発明DNAは、本発明により初めて単離されたDNAであり、ヘパラン硫酸2-O-硫酸

[0016]

This invention DNA is DNA isolated for the first time by this invention.  
If at least one part of polypeptide of

基転移酵素（以下「HS2ST」とも記載する）のポリペプチドの少なくとも一部をコードしているのであればその塩基配列は特に限定はされない。また、本発明DNAが有する塩基配列がコードするHS2STのポリペプチドは硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよく、そのようなDNAのいずれもが本発明のDNAに包含される。該活性の測定方法は公知であり（例えば、J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996)）、当業者であれば、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位をアミノ酸配列に有する本酵素を容易に選択することができる。

#### 【0017】

配列番号14に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号39は、好ましくは中性アミノ酸、より好ましくはセリン又はアラニンであり、アミノ酸番号67は、好ましくは中性アミノ酸、より好ましくはスレオニン又は

heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases (it describes it also as "HS2ST" below) is coded, as for the base sequence, limitation in particular will not be made.

Moreover, polypeptide of HS2ST which base sequence which this invention DNA has codes may have substitution, deletion, insertion, or dislocation of 1 or more amino acid residue which does not injure substantially activity which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor alternatively from sulfuric-acid group donor, and all of such DNA are included by DNA of this invention.

This active measuring method is public knowledge (for example, J.).

If it is Biol.Chem.271, 7645-7653 (1996), and those skilled in the art, it can choose easily this enzyme which it has in substitution and deletion sequence of 1 or more amino acid residue which does not injure this activity substantially by making enzyme active target existence into index.

#### [0017]

In the amino acid sequence shown in sequence number 14, preferably the amino acid number 39 is a neutral amino acid, more preferably, they are serine or alanine.

Preferably the amino acid number 67 is a neutral amino acid, more preferably, they are threonine or alanine.

アラニンであり、アミノ酸番号 68 は、好ましくは疎水性アミノ酸、より好ましくはロイシン又はバリンであり、アミノ酸番号 74 は、好ましくはメチオニン又はイソロイシンであり、アミノ酸番号 100 は、好ましくは塩基性アミノ酸、より好ましくは、リジン又はアルギニンであり、アミノ酸番号 130 は、好ましくは水酸基含有アミノ酸、より好ましくはセリン又はスレオニンであり、アミノ酸番号 132 は、好ましくはリジン又はアスパラギンであり、アミノ酸番号 142 は、好ましくは疎水性アミノ酸、より好ましくはバリン又はイソロイシンであり、アミノ酸番号 277 は、好ましくは酸性アミノ酸、好ましくはグルタミン酸又はアスパラギン酸である。なお、ここで、塩基性アミノ酸とは、好ましくはヒスチジン、リジン及びアルギニンを意味し、酸性アミノ酸とは、好ましくはグルタミン酸及びアスパラギン酸を意味し、中性アミノ酸とは、酸性でも塩基性でもないアミノ酸即ち通常の生体環境で電荷を有さないアミノ酸、好ましくはグリシン、アラニン、セリン、スレオニンを意味し、疎水性アミノ酸とは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチ

Preferably the amino acid number 68 is a hydrophobic amino acid, more preferably, they are leucine or valine.

Preferably amino acid number 74 is methionine or isoleucine.

Preferably amino acid number 100 is basic amino acid, more preferably, they are lysine or arginine.

Preferably the amino acid number 130 is a hydroxyl-containing amino acid, more preferably, they are serine or threonine.

Preferably amino acid number 132 is lysine or asparagine.

Preferably amino acid number 142 is hydrophobic amino acid, more preferably, they are the valine or the isoleucine.

Preferably amino acid number 277 is acidic amino acid, and, preferably is glutamic acid or aspartic acid.

In addition, here, preferably basic amino acid means histidine, lysine, and arginine, preferably an acidic amino acid means glutamic acid and the aspartic acid, a neutral amino acid means the amino acid which is not acidic and is not basic, i.e., the amino acid which does not have a charge in the usual biological-body environment, and preferably glycine, alanine, serine and a threonine, and a hydrophobic amino acid means

Glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan, cystein, and

The amino acid which has a hydrophobic nature equivalent to these, preferably, valine, a leucine, and isoleucine.





オニン、トリプトファン、システイン及びこれらと同等の疎水性を有するアミノ酸、好ましくは、バリン、ロイシン及びイソロイシンを意味する。

**【0018】**

上記本発明DNAにおいて、配列番号14に示すアミノ酸配列は、好ましくは配列番号2又は4に示すアミノ酸配列である。また、本発明DNAは、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有さない配列番号14、2又は4に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする塩基配列をコードすることが好ましい。

**【0019】**

本発明DNAとして具体的には、配列番号14に示すアミノ酸配列においてアミノ酸番号1～356で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられ、より具体的には配列番号2においてアミノ酸番号1～356及び配列番号4においてアミノ酸番号1～356で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましい。本発明DNAが有する塩基配列としてさらに具体的には、配列番号1及び配列番号3に示す塩基配列の少なくとも一部ま

**[0018]**

In above-mentioned this invention DNA, the amino acid sequence shown in sequence number 14 is an amino acid sequence preferably shown in sequence number 2 or 4. Moreover, as for this invention DNA, it is desirable to code the base sequence which codes at least one part of the amino acid sequence shown in sequence number 14, 2, or 4 which does not have the substitution, deletion, insertion, or dislocation of an amino acid residue.

**[0019]**

DNA which has base sequence which codes amino acid sequence which DNA which has base sequence which codes amino acid sequence expressed with amino acid number 1-356 in amino acid sequence specifically shown in sequence number 14 is mentioned, and is expressed with amino acid number 1-356 in amino acid number 1-356 and sequence number 4 in sequence number 2 more specifically as this invention DNA mentions and is desirable.

As base sequence which this invention DNA has, moreover specifically, DNA of base sequence shown in sequence. number 1 and sequence number 3 which has part or all at least mentions and is especially preferable.

たは全てを有するDNAが挙げられ、かつ特に好ましい。このようなDNAとして具体的には、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号24～1091及び配列番号3に示す塩基配列における塩基番号355～1422の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

DNA which has base sequence of base number 355-1422 in base sequence specifically shown in base number 24-1091 and sequence number 3 in base sequence shown in sequence number 1 as such DNA is mentioned.

#### 【0020】

配列番号1及び配列番号3に示す塩基配列において、HS2STcDNAのオープンリーディングフレームの5'末端部には4つのイン・フレームのATGコドンが含まれている。第1番目のATGコドンの周囲の塩基配列は、真核細胞の翻訳開始部位の共通配列と比較すると、-3の位置のプリンは保存されていないが、+4の位置のG（グアニン）が保存されている。このことは、効率的な翻訳には、-3の位置にプリンがないときは+4の位置のGが必須であるというKozakの知見(Kozak, M. (1986)Cell, 44,283-292)を満足している。また、第2番目、第3番目、第4番目のATGコドンの周囲の塩基配列も、-3の位置がプリン（それぞれA（アデニン）、A、G）であり、+4はGではなく、それぞれA、C（シトシン）、Cであって共通配列に部分的に適合しており、いずれ

#### [0020]

In the base sequence shown in sequence number 1 and sequence number 3, ATG codon of four in frames is contained in 5' terminal part of open reading frame of HS2STcDNA.

As for base sequence around 1st ATG codon, purine of position of -3 is not preserved compared with consensus sequence of translation start part of eukaryotic cell.

However, G (guanine) of position of +4 is preserved.

This, in efficient translation

When there is no purine in position of -3

It is said that G of position of +4 is indispensable.

It has satisfied realization (Kozak, M.(1986) Cell, 44,283-292) of Kozak.

Moreover, also base sequence around ATG codon of 2nd, 3rd, and 4th, position of -3 is purine (respectively A (adenine), A, G).

+4 is not G but each A, C (cytosine), and C, and conforms to consensus sequence partially, any ATG codon may function as initiating codon.

However, since ATG codon of 4th is equivalent to hydrophobic part of transmembrane\_domain

のATGコドンも開始コドンとして機能する可能性がある。しかしながら、第4番目のATGコドンはアミノ酸配列において膜貫通領域の疎水部位に当たるため、翻訳開始部位として機能する可能性は低い。

## 【0021】

ところで、 $\beta$ -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、フレーム内に2つのATGコドンを含むことが知られている (Nakazawa, K. et al. (1988) J.Biochem, 104, 165-168、Shaper, N. et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10420-10428)。また、Shaperらは、 $\beta$ -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、2箇所からの翻訳開始の結果、長いものと短いものとの両方の形態が合成されることを示している。さらに、Lopezらは、長い形態のものは原形質膜を優先的に標的とし、短い形態のものは主としてゴルジ体内に存在することを示唆する証拠を示している (Lopez, L. et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 15984-15591)。同様に、HS2STについても、複数のATGコドンが開始コドンとして機能する可能性はあるが、定かではない。しかし、いずれのATGコドンが開始コドンであっても、上記の硫酸基転移酵素の

## [0021]

Apart from that, it is known that (beta)-1,4-galactosyl transferases contain two ATG codon in frame (Nakazawa, K. et al. (1988) J.Biochem, 104, 165-168, Shaper, N. et al. (1988) J.Biol.Chem., 263, 10420-10428).

Moreover, as for Shaper and others, (beta)-1,4-galactosyl transferases show that form of both long thing and short thing is compounded as a result of translation start from two places.

Furthermore, one of form with long Lopez and others makes plasma membrane target preferentially, proof which suggests that one of short form exists mainly in Golgi inside of the body is shown (Lopez, L. et al. (1991) J.Biol.Chem., 266, 15984-15591).

Similarly, two or more ATG codon may function as initiating codon also about HS2ST.

However, it is not certain.

However, even if which ATG codon is initiating codon, it is the same at point which codes polypeptide of the above-mentioned sulfuric-acid group transferases.

DNA which has base sequence which begins from ATG codon of 2nd in base sequence of sequence number 1 and sequence number 3, 3rd, and 4th is also included by this invention.

リペプチドをコードする点では同じであり、配列番号1及び配列番号3の塩基配列における第2番目、第3番目、第4番目のATGコドンから始まる塩基配列を有するDNAも本発明に包含されるものである。

## 【0022】

配列番号1の最初のATGコドンで始まる単一のオープンリーディングフレームからは、356アミノ酸残基からなり、分子量41,830、N-結合グリコシレーション部位である可能性のある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したヒドロパシープロット(図2)から、N-末端から14~27番目のアミノ酸残基にわたる長さ14残基の1つの顕著な疎水性部分が認められ、トランスメンブレン(膜貫通)ドメインを有することが予想される。また、配列番号3の最初のATGコドンで始まる単一のオープンリーディングフレームからは、356アミノ酸残基からなり、分子量41,868、N-結合グリコシレーション部位である可能性のある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したヒドロパシープロットから、N-末端から14~27番目のアミノ酸残基に

## [0022]

From single open reading frame which starts with ATG codon of beginning of sequence number 1, it is made up of 356 amino acid residues, and protein which has two parts which may be molecular weight 41,830, N-joint glycosylation part is estimated.

One remarkable hydrophobic part of length 14 residue covering the 14 to 27th amino acid residue being observed from N-terminal from hydropathy plot (FIG. 2) made from this amino acid sequence, and having trans-membrane (membrane penetration) domain from it is expected.

Moreover, from single open reading frame which starts with ATG codon of beginning of sequence number 3, it is made up of 356 amino acid residues, and protein which has two parts which may be molecular weight 41,868, N-joint glycosylation part is estimated.

One remarkable hydrophobic part of length 14 residue covering the 14 to 27th amino acid residue being observed from N-terminal from hydropathy plot made from this amino acid sequence, and having trans-membrane (membrane penetration) domain from it is expected.

わたる長さ14残基の1つの顕著な疎水性部分が認められ、トランスメンブレン（膜貫通）ドメインを有することが予想される。

## 【0023】

本発明DNAは、このDNAが有する塩基配列によってコードされるHS2STのポリペプチドが、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に選択的に転移する活性を実質的に害されない限り、1つ又は2つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を起こすようなヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよい。ヌクレオチドの置換、欠失、挿入又は転位は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法（Kramer,W. and Frits,H.J.,Meth. in Enzymol., 154, 350(1987);Kunkel,T.A. et al., Meth. in Enzymol.,154,367(1987))などの方法によっても、DNAに置換、欠失、挿入又は転位を導入することができる。本酵素の活

## [0023]

For this invention DNA, polypeptide of HS2ST coded by base sequence which this DNA has, unless activity which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in heparan sulfate which is sulfuric-acid group receptor alternatively from sulfuric-acid group donor is injured substantially, it may have substitution, deletion, insertion, or dislocation of nucleotide which starts the substitution, deletion, insertion, or dislocation of the amino acid residue more than an one or two. It can transduce substitution, deletion, insertion, or dislocation of nucleotide into DNA by having restriction enzyme cutting terminal in both terminal, compounding sequence including both sides of varying point, and changing for part to which base sequence which un-varying DNA has corresponds. Moreover, it can transduce substitution, deletion, insertion, or dislocation into DNA also by method, such as the site-specific varying method (Kramer, W.and Frits, H.J., Meth.in Enzymol., 154, 350(1987);Kunkel, T.A.et al., Meth.in Enzymol., 154,367 (1987)). Active measuring method of this enzyme is public knowledge (for example,

性の測定方法は公知であり(例えば、J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996))、当業者であれば、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位をアミノ酸配列に有する本酵素をコードするDNAにおける塩基配列の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。

**【0024】**

なお、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。さらに、染色体由来のHS2ST遺伝子は、コード領域にイントロンを含むことが予想されるが、そのようなイントロンで分断されているDNA断片であっても、HS2STのポリペプチドの少なくとも一部をコードする限り、本発明のDNA断片に包含される。すなわち、本明細書において「コードする」とは、転写時にプロセッシングを受けて最終的に目的のポリペプチドを生じうる塩基配列を有することも包含する。

**【0025】**

また、本明細書において「ポリ

J.Biol.Chem.271, 7645-7653 (1996)), and if it is those skilled in the art, it can choose easily substitution of 1 or more amino acid residue which does not injure this activity substantially, deletion, insertion, or dislocation by making enzyme active target existence into index.

**[0024]**

In addition, if it is those skilled in the art that DNA which has a different base sequence by the degeneracy of a genetic code is also included by this invention DNA, he will just be going to be understood easily.

Furthermore, it is expected that the HS2ST gene derived from a chromosome contains the intron in a coding region.

However, it is included by DNA fragment of this invention as long as at least one part of polypeptide of HS2ST is coded, even if it is DNA fragment divided by such intron.

That is, it also includes having base sequence which may eventually produce target polypeptide in response to processing at the time of transfer "it codes" in this specification.

**[0025]**

Moreover, a certain active part which is, makes



ペプチドの少なくとも一部をコードする」とは、好ましくは、HS 2 S T活性を有する、抗原性を有するなどの何らかの活性ないし機能を有する部分、あるいは、その部分に相当する塩基配列がそのHS 2 S Tに特異的であって、プライマーやプローブとして使用できる部分をコードすることを意味する。

## 【0026】

なお、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNAまたはRNAも包含される。さらに本発明のDNAは、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素をコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な配列を有するDNA鎖またはRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。

## 【0027】

また、本発明DNAは、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチド全体をコードするコード領域全長の塩基配列を有していてもよく、またヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプチドの一部をコードする塩基配列を有するものであってもよい。

## 【0028】

特に、配列番号2に示すアミノ

and has function, such as having HS2ST activity preferably in this specification, saying "it codes at least one part of polypeptide" and having antigenicity, or base sequence which corresponds to the part is specific to the HS2ST, comprised such that it means coding the part which can be used as a primer or a probe.

## [0026]

In addition, complementary DNA or complementary RNA is also included by this invention DNA at this invention DNA.

Furthermore, single strand of only coding strand which codes heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases is sufficient as DNA of this invention, and double strand which is made up of this single strand and DNA strand which has sequence complementary to this, or RNA strand is sufficient as it.

## [0027]

Moreover, this invention DNA may have base sequence which may have base sequence of coding-region full length which codes the whole polypeptide of heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases, and codes a part of polypeptide of heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases.

## [0028]

Particularly glycosaminoglycan sulfuric-acid

酸配列を有するポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素は、本発明者らによってチャイニーズハムスターの卵巣由来の培養細胞（CHO細胞：ATCC CCL61）から精製されたヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素 (Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K.(1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653) であり、下記のような理化学的性質を有する。

(1)作用：硫酸基供与体から、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれる L-イズロン酸残基の 2 位の水酸基に硫酸基を選択的に転移する。すなわち、上記硫酸基受容体の L-イズロン酸の 2 位水酸基以外には実質的に硫酸基を転移しない。硫酸基供与体としては活性硫酸 (3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸; 以下「PAPS」とも記載する) が好適には挙げられる。グルコサミン残基には実質的に硫酸基を転移しない。

(2)基質特異性：ヘパラン硫酸および CDSNS-ヘパリンには硫酸基を転移するが、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸およびケラタン硫酸には硫酸基を転移しない。

(3)至適反応 pH：本酵素は pH 5.0～6.5 の範囲、特に pH 5.5 付近の反応液中で高い

group transferases including polypeptide which has amino acid sequence shown in sequence number 2 is heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases refined by present inventors from cultured cell (CHO cell: ATCC CCL61) derived from ovary of Chinese hamster.

(Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K.(1996) J.Biol.Chem.271,7645-7653).

It has the following physicochemical properties.

(1) Effect : transfer sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor from sulfuric-acid group donor alternatively.

That is, except for 2-position hydroxyl group of L- iduronic acid of the above-mentioned sulfuric-acid group receptor, it does not transfer sulfuric-acid group substantially.

As sulfuric-acid group donor, active sulfate (3'-phospho adenosine 5'-phosphosulfate; it describes it also as "PAPS" below) is mentioned suitably.

It does not transfer sulfuric-acid group to glucosamine residue substantially.

(2) Substrate specificity : transfer a sulfuric-acid group to a heparan sulfate and a CDSNS-heparin.

However, it does not transfer a sulfuric-acid group to the chondroitin, a chondroitin sulfate, the dermatan sulfate, and keratan sulfate.

(3) Optimum reaction pH : this enzyme has high sulfuric-acid group transfer activity in the range of pH5.0-6.5, especially the reaction mixture near pH5.5.





硫酸基転移活性を有する。

(4)至適反応イオン強度：本酵素の活性は反応イオン強度の増加にともなって増加し、NaClの場合、50～200 mM、特に100 mM付近で最も高い活性を示す。この範囲を超えてNaCl濃度が増加すると活性は徐々に低下し、500 mMでは活性は極めて低くなる。

(5)阻害及び活性化

本酵素はプロタミンを反応液中に共存させることにより活性が増大する。約0.013 mg/ml以上のプロタミンにより、プロタミン非存在下に比して約3倍に酵素活性が増大する。

(4) Optimum reaction ionic strength : the activity of this enzyme increases with increase in reaction ionic strength, and, in NaCl, shows 50 to 200 mM, and the highest activity particularly near 100 mM.

If NaCl concentration increases exceeding this range, activity will fall gradually, and in 500 mM, activity becomes very low.

(5) An obstruction and activation

When this enzyme lets the protamine exist together in a reaction mixture, activity increases.

By protamine about 0.013 mg/ml or more, enzyme activity increases by about 3 times as compared with protamine absence.

【0029】

また、本酵素の活性はアデノシン-3', 5'-ジリン酸(3', 5'-ADP)を反応液中に共存させることにより阻害される。尚、本酵素の活性は10 mM以下のジチオスレイトール(DTT)を反応液中に共存させることによってほとんど影響を受けない。

(6)分子量：N-グリコシダーゼ(ジェンザイム(Genzyme)社製)処理後の非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により推定される分子量：約38,000。

[0029]

Moreover, the activity of this enzyme is obstructed by letting adenosine- 3',5'-diphosphoric acid (3',5'-ADP) exist together in reaction mixture.

In addition, the activity of this enzyme is hardly influenced depending on letting dithiothreitol (DTT) 10 mM or less exist together in reaction mixture.

(6) Molecular weight :

Molecular weight presumed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis in non-reduction condition after N-glycosidase (made by Genzyme (Genzyme)) treatment: About 38,000.

## 【0030】

スーパーロース12 (ファルマシア-LKB 社製) ゲルクロマトグラフィーにより推定される分子量: 約130,000。

## (7)ミカエリス定数

硫酸基の受容体としてCDSNS-ヘパリンを、硫酸基の供与体としてPAPSをそれぞれ用いたときの本酵素のPAPSに対するミカエリス定数 ( $K_m$ ) は、約0.20  $\mu M$ である。

## [0030]

Molecular weight presumed by super sirloin 12 (made by Pharmacia-LKB) gel chromatography: About 130,000.

(7) Michaelis constants ( $K_m$ ) with respect to PAPS of this enzyme when using CDSNS-heparin as a receptor of Michaelis-constant sulfuric-acid group, and each using PAPS as donor of sulfuric-acid group are about 0.20 micronM(s).

## 【0031】

このような性質を有する硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されるものである。以下、本発明DNAを得る方法について説明する。本発明により本発明DNAが有する塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかにされたので、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法 (ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法) によって染色体DNAあるいはmRNAから本発明のDNAを増幅することによって取得することも可能であり、また、特に、以下の各工程からなるcDNAクローニングにより製造することも可能である。

(1)精製したヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のポリペプ

## [0031]

DNA which has base sequence which codes polypeptide of sulfuric-acid group transferases which has such character is also included by this invention DNA.

Hereafter, it explains method to obtain this invention DNA.

Amino acid sequence coded by base sequence which this invention DNA has by this invention was clarified, therefore, it can also manufacture by cDNA cloning which can also acquire by amplifying DNA of this invention from Chromosomes DNA and mRNA by PCR method (the polymerase chain reaction method) using oligonucleotide primer made based on the sequence, and is particularly made up of each following process.

(1) Determine at least 1 part of amino acid sequence of polypeptide of refined heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases.

(2) Produce oligonucleotide primer based on the above-mentioned amino acid sequence.

チドの少なくとも一部のアミノ酸配列を決定する。

(2)上記アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを作製する。

(3)培養細胞より抽出したRNAから上記プライマーを用いてPCR法によりcDNAを増幅することによって前記硫酸基転移酵素のプロープを製造する。

(4)上記プロープによって培養細胞又は生体組織由来のcDNAライブラリーをスクリーニングする。スクリーニングによって、通常には、上記硫酸基転移酵素の完全長cDNAを選択する。

(3) Manufacture probe of said sulfuric-acid group transferases by amplifying cDNA by PCR method using the above-mentioned primer from RNA extracted from cultured cell.

(4) Screen cultured cell or cDNA library derived from biological tissue with the above-mentioned probe. By screening, it chooses perfect length cDNA of the above-mentioned sulfuric-acid group transferases as usual.

#### 【0032】

しかし、本発明のDNAの製造方法はこれに限定されるものではなく、上記PCR法や、他の公知のcDNAクローニングの手法によっても本発明DNAを製造することができる。

#### [0032]

However, manufacturing method of DNA of this invention is not limited to this, and can manufacture this invention DNA also with the procedure of cDNA cloning Above PCR method and other public knowledge.

#### 【0033】

以下に、本発明のDNAを製造する方法の一例を具体的に説明する。

(1)ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(HS2ST)のアミノ酸配列の決定

(i)HS2STの精製

ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転

#### [0033]

Below, it specifically explains an example of method which manufactures DNA of this invention.

(1) Determination of amino acid sequence of heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases (HS2ST)

(i) Purification of HS2ST

It can refine heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid

移酵素は、チャイニーズハムスターの卵巢由来の培養細胞などへパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素を発現する細胞から、通常のタンパク質の精製方法、および通常のグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の精製方法を組み合わせることによって精製することが可能である。具体的には、J. Biol. Chem. 271,(13),7645-7653,(1996)に記載された方法に従って行うことができる。

## 【0034】

(ii)へパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素の部分アミノ酸配列の決定  
精製したHS2STには糖鎖が結合していることが知られているので、この糖鎖を除去するために精製HS2STをN-グリカナゼなどの糖鎖分解酵素で消化し、脱グリコシル化されたHS2STをSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)等で分離し、ポリビニリデンフルオリド (polyvinylidene fluoride; PVDF)膜やニトロセルロース膜などに転写する。この膜をクマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)やアミドブラックなどのタンパク質を染色する色素で染色し、N-グリカナゼ消化後に形成したタンパク質バンドを切

group transferases by combining purification method of usual protein, and purification method of usual glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases from cell which expresses heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases, such as cultured cell derived from ovary of Chinese hamster.

Specifically, j.Biol.Chem. 271,(13),7645-7653,(1996)  
It can carry out according to method described by these.

## [0034]

(ii) It is known that sugar chain has connected with HS2ST in which partial amino acid sequence of heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases made determination purification, therefore, in order to remove this sugar chain, it digests purification HS2ST by sugar-chain degradation enzymes, such as N-glycanase, and it separates deglycosylation-ized HS2ST by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) etc., and transfers on polyvinylidene fluoride (polyvinylidene fluoride; PVDF) membrane, nitrocellulose membrane, etc.

Pigment which it dyes protein, such as coomassie brilliant blue (CBB) and amido black, dyes this membrane, and it cuts down protein band formed after N-glycanase digesting, and uses for fragmentation.

り出して断片化に用いる。

**【0035】**

断片化の方法は特に限定はされないが、上記タンパク質バンドにタンパク質分解酵素を接触させるなど、公知の方法でタンパク質を断片化することができる。具体的なタンパク質分解酵素の例としてはエンドプロテイナーゼ Lys-C、エンドプロテイナーゼ Asp-Nなどが挙げられる。ゲルからバンドを切りだし、タンパク質分解酵素に接触させ、その後 SDS-PAGEなどで分離してもよい。簡便な操作としては、Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirshner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106 の方法がある。すなわち、タンパク質バンドを切り出して別のゲルのウェルに挿入し、タンパク質分解酵素を含む緩衝液を、挿入したゲルに乗せて SDS-PAGE を行い、色素マーカーの先端が分離ゲルにはいる直前に電源を切ることによって泳動を一時中断し、約 30 分間酵素消化を行い、その後電気泳動を再開するという方法である。この方法によれば酵素消化と消化後のペプチド断片の分離が単一工程でできるため好ましい。断片化によって生じたペプチドを PVDF 膜やニトロ

**[0035]**

As for the method of fragmentation, limitation in particular is not made.

However, it can fragmentize protein by the method of public knowledge, such as letting the above-mentioned protein band contact protease etc.

As an example of detailed protease, end proteinases Lys-C, end proteinases Asp-N, etc. are mentioned.

It cuts down a band from the gel and lets a protease contact.

After that, it is sufficient to separate by SDS-PAGE etc.

As simple operation, it is Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirshner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106. There exists method.

That is, it is method of interrupting migration temporarily, performing enzyme digesting for about 30 minutes, and after that restarting electrophoresis, by turning off power, just before putting on gel which cut down protein band, inserted in well of another gel, and inserted buffer including protease, performing SDS-PAGE and front end of pigment marker being in resolving gel.

Since separation of peptide fragment after enzyme digesting and digesting can be carried out in single process according to this method, it is desirable.

After transferring peptide produced by fragmentation on PVDF membrane, nitrocellulose membrane, etc., it dyes peptide

セルロース膜などに転写した後、CBBまたはアミドブラックなどを用いてペプチドを染色し、ペプチドのバンドを切り出す。タンパク質分解酵素消化後に生じたペプチドを含むPVDF膜やニトロセルロース膜などは、公知の方法でペプチドのアミノ末端配列決定を行うことが可能である。具体的にはモデル476Aプロテインシーケンサー（アプライド バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製）などを用いてアミノ酸の配列を分析することが好ましいがこれに限定はされない。なお、業者に依頼してアミノ酸配列を決定してもらうことも可能である。

## 【0036】

(iii)オリゴヌクレオチドプライマーの合成  
HS2STの部分的アミノ酸配列に基づき、PCR用オリゴヌクレオチドプライマーを作成する。アミノ酸配列のうち、なるべくコドンの縮重が少ない部位を用いることが好ましい。このようなプライマーの例を、図1に示す（センスプライマー：配列番号8、9；アンチセンスプライマー：配列番号10、11）。

## 【0037】

(2) HS2ST部分的cDN

using CBB or amido black, and cuts down band of peptide.

PVDF membrane, nitrocellulose membrane, etc. including peptide produced after protease digesting can perform amino-terminus sequencing of peptide by the method of public knowledge.

Although it is desirable to analyze sequence of amino acid using model 476A protein sequencer (made by Applied Biosystems (Applied Biosystems)) etc. specifically, limitation is not made to this.

In addition, it can request a worker and can also have an amino acid sequence determined.

## [0036]

(iii) Composition of an oligonucleotide primer  
Based on the partial amino acid sequence of HS2ST, it makes the oligonucleotide primer for PCR.

It is desirable to use a part with as possible little degeneracy of the codon among amino acid sequences.

The example of such a primer is shown in FIG. 1 (sense primer: sequence number 8, 9; Antisense primer: Sequence number 10 and 11.

## [0037]

(2) Manufacture of HS2ST-segment-cDNA, and

## Aの調製とプローブの作成

(1)全RNAは、公知の方法 (Kingston, R. S., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York など) で得ることができる。材料は、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素のmRNAを発現している材料であれば限定はされないが、取り扱いの容易さ、および増殖可能な点で培養細胞が好ましい。培養細胞の中でも特にチャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO細胞: ATCC CCL61) が本酵素が強く発現し、酵素活性も比較的高いため好ましい。上記培養細胞の培養に用いる培地は特に制限されないが、大量の細胞を効率よく得るには、スピナーフラスコなどによる浮遊細胞の培養に適した物が好ましい。具体的にはCHO細胞を使用する場合には浮遊培養用のCHO-S-SFMII培地 (ギブコ製) などの市販の培地を用いてもよい。上記のような培地を用いてスピナーフラスコを使用して通常の培養細胞と同様にして培養すればよい。培養は、炭酸ガスインキュベーター中で行うことが好ましく、インキュベーター中の炭酸ガス濃度が5~7%、空気が95~93%となるように調整

## creation of a probe

(1) It can obtain an all RNA by the method (Kingston, R.S., in Current Protocols in Molecular Biology (1991), Suppl.14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York etc.) of public knowledge.

Limitation will not be made if material is a material which expresses mRNA of heparan-sulfate 2-O- sulfuric-acid group transferases.

However, cultured cell is desirable at ease of handling, and point which can be increased.

In ovarian cells (CHO cell: ATCC CCL61) of Chinese hamster, this enzyme expresses strongly particularly among cultured cell, since enzyme activity is also comparatively high, it is desirable.

Medium in particular that it uses for culture of the above-mentioned cultured cell is not restricted.

However, in order to obtain a lot of cell efficiently, thing appropriate to culture of float cell with spinner flask etc. is desirable.

When using CHO cell specifically, it is sufficient to use commercial media, such as CHO-S-SFMII medium for suspended cell cultures (product made from Gibson).

What is sufficient is just to cultivate like usual cultured cell using spinner flask using the above media.

It is desirable to perform culture in carbon-dioxide incubator, and it is desirable to adjust so that it may become 5 to 7% of carbon-dioxide concentration in incubator and 95 to 93% of air.

することが好ましい。また、温度は37～38℃程度に調整することが好ましい。

Moreover, as for temperature, it is desirable to adjust to about 37 - 38 degrees C.

#### 【0038】

全RNAは、前述のように培養した培養細胞から通常用いられる全RNAの調製方法により得ることができるが、グアニジンチオシアネート／CsCl法 (Kingston, R. E., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York)で調製することが好ましい。

#### [0038]

It can obtain all RNA from cultured cell cultured as mentioned above with preparation method of all RNA ordinarily used.

However, it is desirable to prepare by guanidine thiocyanate / CsCl method (Kingston, R.E., in Current Protocols in Molecular Biology (1991), Suppl.14, Unit 4.2, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York).

#### 【0039】

(2)ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの調製  
ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、上記のようにして得られた全RNAから、オリゴdT(oligo-(dT))セルロースカラムクロマトグラフィーなどによって精製することができる。

#### [0039]

(2) Manufacture of poly (A)<sup>+</sup>RNA

Oligo dT (oligo-(dT)) cellulose column chromatography etc. can refine poly (A)<sup>+</sup> RNA from all RNA obtained as mentioned above.

#### 【0040】

(3)PCR法によるHS2ST部分的cDNAの増幅  
上記ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写PCRにより、HS2ST部分的cDNAを増幅することができる。PCRは、通常の方法と同様にして

#### [0040]

(3) Amplification of HS2 ST-segment-cDNA by PCR method

Let the above-mentioned poly (A)<sup>+</sup>RNA be casting mould, by reverse transcription PCR using oligonucleotide primer, it can amplify HS2 ST-segment-cDNA.

What is sufficient is just to perform PCR like usual method.



行えばよいが、具体的方法を示すならば以下の通りである。1  $\mu$  l のポリ(A)<sup>+</sup>RNA、100 pmol の前述のオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ500  $\mu$  M の4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、200単位のM-MLV逆転写酵素（ギブコBRL(Gibco BRL))、1 mMジチオスレイトール（DTT）、120単位のRNase（リボヌクレアーゼ）インヒビター（宝酒造（株）製）を含む緩衝液（終体積20  $\mu$  l）を37℃で60分間インキュベートし、cDNA一次鎖を合成する。次に、上記の逆転写反応混合液2  $\mu$  l、1  $\mu$  Mのオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ200  $\mu$  Mの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、1.25単位のTaqポリメラーゼを含む反応液（終体積50  $\mu$  l）に対し、94℃1分、60℃2分、72℃2分を3サイクル行い、次いで60℃2分の工程の温度を3サイクルごとに2℃ずつ下げながら48℃まで繰り返し、さらに48℃で17サイクル繰り返して行う。

## 【0041】

このようにして得られた部分的cDNAは、cDNAライブラリーから完全長cDNA（コード領域全長を含むcDNA）を

However, it will be as follows if the detailed method is shown.

It incubates poly (A)<sup>+</sup> RNA of 1 microliter, the above-mentioned oligonucleotide primer of 100 pmol, and buffer (volume 20 microliter) that each contains four kinds of deoxy nucleoside triphosphate of 500 micronM, 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL (Gibco BRL)), 1-mM dithiothreitol (DTT), and 120 unit RNase (ribonuclease) inhibitor (product made from Takara Shuzo) for 60 minutes at 37 degrees C, it compounds a cDNA primary strand.

Next, oligonucleotide primer of above reverse transcription reaction mixed-liquid 2 microliter and 1 micronM, they are each four kinds of deoxy nucleoside triphosphate of 200 micronM, as opposed to reaction mixture (volume 50 microliter) including 1.25 unit Taq polymerase, it performs 72-degree-C 2 3-cycle minutes, and it performs 17 cycles for 60-degree-C 2 minutes for 94-degree-C 1 minute repeatedly at 48 more degrees C to 48 degrees C, lowering 2 degrees C of temperature of 60-degree-C process for 2 minutes at a time every 3 cycles then.

## [0041]

Thus, obtained partial cDNA is used as a hybridization probe for screening perfect length cDNA (cDNA including coding-region full length) from cDNA library.

スクリーニングするためのハイブリダイゼーションプローブとして用いられる。

## 【0042】

(3) cDNAライブラリーの作成

(i) cDNAの合成と組換えDNAの作成

cDNAは、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とした逆転写酵素反応により通常の方法を用いて合成することができる。合成する際は市販のcDNA合成用キットを用いるのが便利である。例えばTimeSaver cDNA synthesis kit (ファルマシアLKBバイオテクノロジー)を用いると、cDNAの合成およびcDNAをクローニングベクターに連結することもできる。また、市販のcDNAライブラリーを用いることにより、より簡便にcDNAを得ることも可能である。本発明においてもCHO細胞のcDNAライブラリーであるストラタジーン製のLambda ZAPライブラリー及びヒト胎児脳由来のcDNAライブラリーであるクロンテック製のλgt11ライブラリーを用いている。クローニングベクターに結合した状態のこれらの組換えDNAを宿主細菌細胞中に導入(トランスフェクション)する。用いる宿主

## [0042]

(3) Creation of a cDNA library

(i) Composition of cDNA, and creation of recombinant DNA

cDNA is poly (A)<sup>+</sup> RNA possible to synthesise using usual method according to reverse-transcriptase reaction used as casting mould.

When compounding, it is convenient to use commercial kit for cDNA composition.

For example, if TimeSaver cDNA synthesis kit (Pharmacia LKB biotechnology) is used, it can also connect composition of cDNA, and cDNA with cloning vector.

Moreover, it can also obtain cDNA more easily by using commercial cDNA library.

Also in this invention, it uses (lambda)gt11 library made from Clontech which are Lambda ZAP library made from Stratagene which is cDNA library of CHO cell, and cDNA library of human fetus brain origin.

It transduces these recombinant DNA in the state where it connected with cloning vector, into host bacteria cell (transfection).

It is necessary to choose host bacteria cell to be used by cloning vector to be used.

Usually, although combination of cloning vector and Escherichia coli which make host Escherichia coli (Escherichia coli: Escherichia coli (E.coli)) is frequently used, limitation is not made to this.

Transfection is performed by ordinarily mixing

細菌細胞は、用いるクローニングベクターにより選択する必要があるが、通常は大腸菌（エシエリキア・コリ：Escherichia coli(E. coli))を宿主とするクローニングベクターと大腸菌との組み合わせが頻用されているがこれに限定はされない。トランスフェクションは通常、組換えDNAと30mM塩化カルシウムの存在下で細胞膜の透過性を変化させた大腸菌とを混合することにより行われる。Lamda ZAPやλgt11のようなλファージベクターの場合、組換えDNAを直接塩化カルシウム処理した大腸菌に導入もできるが、予め試験管中でファージ外殻に入れて（in vitro パッケージングという）、大腸菌に効率よく感染させる方法が一般に使用されており、市販されているパッケージング用のキット（Gigapack II packaging extract、ストラタジーン(Stratagene)製等）を用いてパッケージングを行うことも可能である。パッケージングした組換えDNAは、大腸菌にトランスフェクションするが、用いるクローニングベクターによって用いる大腸菌株を選択する必要がある。すなわち、抗生物質耐性遺伝子を含むクローニングベクターを用いる場合は、大腸菌に抗生物質に対する耐性の性質が

recombinant DNA and Escherichia coli to which it changed the permeability of cytoplasmic membrane in the presence of 30-mM calcium chloride.

In the case of (lambda) phage vector like Lamda ZAP or (lambda) gt11, recombinant DNA is made also as for transduction to Escherichia coli which made direct calcium chloride treatment.

However, it puts into phage outer covering in test tube beforehand (it calls it in-vitro packaging), generally the method of infecting with Escherichia coli efficiently is used, and it can also perform packaging using kits for packagings (Gigapack II packaging extract, product made from Stratagene (Stratagene), etc.) marketed.

It transfects recombinant DNA which made packaging to Escherichia coli.

However, it is necessary to choose Escherichia-coli stock which it uses by cloning vector to be used.

That is, to use cloning vector which resistant character with respect to antibiotics must not exist in Escherichia coli, and contains genes, such as (beta)- galactosidase gene (lacZ), when using cloning vector including resistance-to-antibiotics gene, it is necessary to choose Escherichia coli which does not express (beta)- galactosidase activity.

This is necessary in order to screen Escherichia coli by which recombinant DNA was transfected.

For example, what is sufficient is just to choose Escherichia-coli stock of E.coli XL-1 Blue or E.coliY1088 grade, when using Lamda ZAP and

あつてはならず、また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lac Z) 等の遺伝子を含むクローニングベクターを用いる場合は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を発現しない大腸菌を選択する必要がある。このことは、組換えDNAがトランスフェクションされた大腸菌をスクリーニングするために必要なことである。例えば、Lambda ZAPや $\lambda$ gt11クローニングベクターを用いる場合、E. coli XL-1 BlueやE. coli Y1088等の大腸菌株を選択すればよい。組換えDNAや組換えプラスミドが導入された大腸菌は抗生物質に対する耐性の獲得や、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の獲得等によりスクリーニングすることが可能である。具体的には、大腸菌を寒天培地にまき、生育したコロニーを選択すればよい。生育した大腸菌（組換えDNAがトランスフェクションされた大腸菌）は、cDNAライブラリーを構成する。プラスミドにブルースクリプトを用いた場合は、指示菌とともに軟寒天培地に懸濁し、寒天培地状に重層してプラークを形成させればよい。DNA断片が挿入されたプラスミドを保持するファージプラークは $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を発現しないので、容易に選択することができ

(lambda)gt11 cloning vector.

It can screen Escherichia coli into which recombinant DNA and recombinant plasmid were transduced by resistant acquisition with respect to antibiotics, acquisition of (beta)-galactosidase activity, etc.

What is necessary is specifically, to wind Escherichia coli around agar and just to choose grown colony.

Grown Escherichia coli (Escherichia coli by which recombinant DNA was transfected) comprises cDNA library.

What is necessary is to suspend in soft agar medium with indicator strain, to stratify in the shape of agar, and just to form plaque, when bluescript is used for plasmid.

Since phage plaque holding plasmid in which DNA fragment was inserted does not express (beta)-galactosidase activity, it can choose easily.

る。

**【0043】**

(ii) HS2ST 完全長 cDNA クローニング

次に上記のようにして得られた cDNA ライブラリーから、HS2ST 完全長 cDNA を有するファージクローンを、HS2ST 部分的 cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションにより選択することができる。ハイブリダイゼーションは、通常の方法に従って行えばよい。選択された陽性クローンから、ファージ DNA を調製し、適当な制限酵素で切断することにより HS2ST cDNA を切り出すことができる。得られた cDNA は、そのまま、あるいは適当なプラスミドにサブクローニングして、塩基配列を決定する。

**【0044】**

上記のようにして決定されたチャイニーズハムスター由来の HS2ST cDNA の塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号 1 に、アミノ酸配列のみを配列番号 2 に示す。また、ヒト由来の HS2ST cDNA の塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号 3 に、アミノ酸配列のみを配列番号 4 に示す。ヒト由来の HS2ST c

**[0043]**

(ii) HS2ST perfect length cDNA cloning

Next, it can choose phage clone which has HS2ST perfect length cDNA from cDNA library obtained as mentioned above by hybridization by using HS2ST-segment-cDNA as probe.

What is sufficient is just to perform hybridization according to usual method.

From selected positive clone, it can prepare Phage DNA and can cut HS2STcDNA out by cutting by suitable restriction enzyme.

It subclones obtained cDNA to plasmid remaining as it is or suitable, and it determines base sequence.

**[0044]**

Base sequence of HS2STcDNA derived from Chinese hamster determined as mentioned above and amino acid sequence expected from this base sequence are shown in sequence number 1, and only amino acid sequence is shown in sequence number 2.

Moreover, base sequence of HS2STcDNA derived from human and amino acid sequence expected from this base sequence are shown in sequence number 3, and only amino acid sequence is shown in sequence number 4.

HS2STcDNA derived from human can use

DNAは、上記チャイニーズハムスター由来のHS2STをプローブとして使用し、ヒト由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても得ることが可能である。

HS2ST derived from the above-mentioned Chinese hamster as a probe, and can obtain it also by screening cDNA library derived from human.

## 【0045】

<2>本発明DNAの塩基配列によってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド  
本発明は、上記の本発明DNAによってコードされるグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドも提供する。本明細書において、上記の「部分」とは、HS2ST活性を有する、抗原性を有するなどの何らかの活性ないし機能を有する部分を意味する。本ポリペプチドは単独であってもよいし、他のポリペプチドと融合していてもよい。本ポリペプチドは、糖鎖を有さないものであってもよい。

## [0045]

<2> Polypeptide which is made up of all or part of polypeptide of glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases coded by base sequence of this invention DNA

This invention also provides the polypeptide which is made up of all or the part of polypeptide of the glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases coded by above-mentioned this invention DNA.

In this specification, the above-mentioned "part" means a certain active part which is, makes and has function, such as having HS2ST activity and having antigenicity.

This polypeptide may be by itself and it may unite it with other polypeptide.

Thing which does not have sugar chain is sufficient as this polypeptide.

## 【0046】

哺乳類の生体内で発現しているHS2STは糖鎖を有するため、糖鎖を有さない本ポリペプチドとは明確に区別される。このようなポリペプチドは、後記のポリペプチドの製造方法によ

## [0046]

Mammalian HS2ST which is making in-vivo expression

Since it has sugar chain, about this polypeptide which does not have sugar chain, it distinguishes clearly.

It can obtain such polypeptide with

って得ることができる。例えば、本発明を哺乳類の細胞に導入することにより、本ポリペプチドに糖鎖が付加されたものを製造することができ、また大腸菌などの原核生物の細胞に導入することにより糖鎖を有さないポリペプチドのみを製造することもできる。また、上記の活性ないし機能の有無を判定することは当業者に公知の方法によって行うことができる。

**【0047】**

特に、配列番号4に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むHS2STは、ヒト組織で発現している新規なヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素であり、従って、本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、硫酸基供与体から硫酸基を、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に転移する酵素活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいポリペプチドを含むグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素を提供する。

**【0048】**

<3>本発明DNAを利用したHS2STポリペプチドの製造

manufacturing method of polypeptide of after-mentioned.

For example, it can also manufacture only polypeptide which does not have sugar chain by transducing this invention into mammalian cell by being able to manufacture that by which sugar chain was added to this polypeptide, and transducing into cell of prokaryotes, such as *Escherichia coli*.

Moreover, it can perform the above-mentioned active thing for which it is, and it makes and judges existence of function by method well-known to those skilled in the art.

**[0047]**

Particularly HS2ST including polypeptide which has amino acid sequence shown in sequence number 4 is new heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases which expresses in human tissue.

Therefore, this invention provides glycosaminoglycan sulfuric-acid group transferases including polypeptide which may have amino acid sequence shown in sequence number 4, and may have substitution, deletion, insertion, or dislocation of 1 or more amino acid residue which does not injure substantially enzyme activity which transfers sulfuric-acid group to hydroxyl group of 2-position of L-iduronic-acid residue contained in glycosaminoglycan which is sulfuric-acid group receptor from sulfuric-acid group donor.

**[0048]**

<3> It cultures cell transformed by manufacturing-method above-mentioned this

## 方法

上記本発明DNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明DNAがコードするポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物から本発明ポリペプチドを採取することによって、HS2STのポリペプチドを製造することができる。

invention DNA using this invention DNA of HS2ST polypeptide by suitable medium, and produce-accumulates in culture polypeptide which this invention DNA codes.

By collecting this invention polypeptide from the culture, it can manufacture polypeptide of HS2ST.

## 【0049】

本発明DNAで形質転換された細胞は、公知の発現ベクターに本発明DNAの断片を挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを用いて形質転換を行うことによって得ることができる。細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。

## [0049]

Cell transformed by this invention DNA can insert fragment of this invention DNA in expression vector of public knowledge, can build recombinant plasmid, and can obtain it by performing transforming using this recombinant plasmid.

As cell, procaryotic cell, such as Escherichia coli, and eukaryotic cells, such as mammal cell, are shown.

## 【0050】

本製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、COS-7細胞等の哺乳類細胞とpCXN2 (Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200)又はpFLAG (イーストマン コダック (Eastman Kodak)製)等の哺乳類細胞用発現ベクターの組み合わせを採用することが好ましい。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち

## [0050]

In this manufacturing method, it can use host-vector system ordinarily used for proteinic manufacture, for example, is mammal cell, such as COS-7 cell, and pCXN2.

(Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200) Or pFLAG (product made from Eastman Kodak (Eastman Kodak))

Combination of expression vector for mammal cell of these etc. are desirable.

Medium and culture condition are suitably chosen according to host, i.e., cell, to be used.



細胞に合わせて適宜選択される。

## 【0051】

本発明DNAは直接発現させてもよいし、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明DNAは全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

## [0051]

It may let this invention DNA express directly, and may let it express as fusion polypeptide with other polypeptide.

Moreover, this invention DNA may let full length express, and may let part express as a partial peptide.

## 【0052】

培養物からの本発明ポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの精製方法によって行うことができる。なお培養物には、培地および当該培地中の細胞が含まれる。

## [0052]

It can perform collection of this invention polypeptide from culture with purification method of polypeptide of public knowledge.

In addition, cell in medium and said medium is included by culture.

## 【0053】

## 【実施例】

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

<1>チャイニーズハムスターのヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素の調製およびアミノ酸配列の分析

J. Biol. Chem. 271, 7645-7653(1996)に記載の方法により2回目の3', 5'-ADP-アガロースカラムからの溶出画分として部分精製したHS2STを得た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(P

## [0053]

## [EXAMPLES]

Below, Example still more specifically explains this invention.

<1> Manufacture of heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases of Chinese hamster, and analysis of amino acid sequence

J. It obtained HS2ST which made partial purification as an elution fraction from the 2nd 3',5'-ADP-agarose column by the method of publication to Biol.Chem.271,7645-7653 (1996).

In order to perform sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis (PAGE), it settles HS2ST of 28 microgram with 10 %

AGE)を行うために、28  $\mu$ gのHS2STを10%トリクロ酢酸により沈殿させ、アセトンで2回洗浄した。この沈殿は、5% (V/V) の2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファーで100℃、3分間還元およびSDS化した後、Laemmli (Laemmli, U.K.(1970) Nature 227, 680-685)の方法に従って10%のポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGEで分離されたタンパク質を、10%メタノールを含有するpH11の10mM 3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸 (CAPS) 溶液中、200mAで2時間30分、ProBlottのPVDF膜(アプライドバイオシステム製)に転写した。転写したタンパク質をAebersoldらの方法 (Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A., Hood, L.E., and Kent, S.B.H.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,6970-6974)に従ってPonceau Sで染色した。45 kDa以下の領域のバンドを切り出し、Iwamatsuの方法 (Iwamatsu, A.(1992) Electrophoresis 13, 142-147)を改変した方法によってPVDF膜上で変性させS-カルボキシメチル化した。膜に転写された

trichloroacetic acid.

Acetone washed twice.

By loading buffer including 5% (V/V) of 2-mercaptoethanol, for 3 minutes at 100 degrees C, this precipitate performed SDS-PAGE using 10% of polyacrylamide gel according to the method of Laemmli (Laemmli, U.K.(1970) Nature 227, 680-685), reduction and after SDS-izing.

It transferred protein separated by SDS-PAGE by 200mA for 2 hours and 30 minutes on PVDF membrane (product made from applied bio-system) of ProBlott in 10-mM3-cyclohexyl amino -1- propane sulfonic-acid (CAPS) solution of pH11 which contains methanol 10%. According to method (Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A., Hood, L.E., and Kent, S.B.H.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 6970-6974) of Aebersold and others, it dyed transferred protein by Ponceau S.

It cut down band of region of 45 or less kDa, and by method which changed the method (Iwamatsu, A.(1992) Electrophoresis 13, 142-147) of Iwamatsu, it made it modify on PVDF membrane, and did S-carboxymethylation.

Protein transferred by membrane is 0.5 M Tris-HCl, pH8.8, 5% (V/V) acetonitrile, and 1 mg. 8M including dithiothreitol (DTT) It reduced at room temperature in guanidine hydrochloride solution 300 microliter for 1 hour.

It added 1N NaOH solution 12 microliter including 3 mg iodoacetic acid there, and put on dark place for 15 minutes.

Distilled water washed this membrane and it washed by 2% acetonitrile which contains SDS

タンパク質は、0.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 5% (V/V) アセトニトリル、1 mg ジチオスレイトール (DTT) を含む 8 M グアニジン塩酸塩溶液 300  $\mu$ l 中で室温で 1 時間還元した。そこに 3 mg のヨード酢酸を含む 1 N NaOH 溶液 12  $\mu$ l を加え、暗所に 15 分間置いた。この膜を蒸留水で洗浄し、その後 0.1% SDS を含有する 2% アセトニトリルで洗浄した。膜上の S-カルボキシメチル化したタンパク質は、1 mg のメチオニンを含む 100 mM の酢酸に溶解した 0.5% ポリビニルピロリジン (PVP-40) 300  $\mu$ l 中で室温で 30 分間インキュベートし、10% (V/V) アセトニトリルで洗浄した。膜を細かく切断し、50  $\mu$ l の Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した 0.3 U の N-グリカナゼで 37°C 15 時間処理した。その後、*in situ* 逐次的消化を、10% (V/V) アセトニトリルを含む pH 9.0 の 20 mM Tris-HCl 中に酵素:基質 (mol:mol) が 1:50 となるように溶解したエンドプロテイナーゼ Lys-C により 37°C で 15 時間行い、続いて 10% (V/V) アセトニトリルを含む pH 7.5 の 20 mM 炭酸水素

0.1% after that.

Protein on membrane of which it did S-carboxymethylation, it incubated for 30 minutes at room temperature in 0.5% polyvinyl pyrrolidone (PVP-40) 300 microliter dissolved in 100 mM acetic acid including 1 mg methionine, and washed by acetonitrile 10% (V/V).

It cuts a film finely, it treated 37 degrees C for 15 hours by N-glycanase of 0.3U dissolved in Tris-HCl (pH7.5) of 50 microliter.

After that, end proteinases Lys-C dissolved so that enzyme:substrate (mol:mol) might be set to 1:50 into 20 mM Tris-HCl of pH9.0 which contains acetonitrile 10% (V/V) performs *in situ* successive digesting at 37 degrees C for 15 hours, next, 10% (v/v) acetonitrile is included.

20 mM and 25 mM CaCl<sub>2</sub> of pH7.5 is included.

In reaction mixture of pH7.8, so that enzyme:substrate (mol:mol) is set to 1:50

It carried at 40 degree C by dissolved end proteinases Asp-N for 24 hours.

It collected these digestive productions, applied to the filter, and freeze-dried.

It dissolves this freeze-dried matter in mobile-phase A(0.06% (V/V) trifluoroacetic acid (TFA))18 microliter which contains acetonitrile 1% (V/V), it performed Capillary HPLC in the reverse phase column (0.3\*150 mm).

The concentration gradient of the mobile phase B to 2% - 100% (80% which contains TFA 0.052% acetonitrile) performed the elution of a peptide in flow-rate 3.3 microliter/min and 100 minutes.

It collected fractions of peptide manually, monitoring absorbance of 214 nm, and blotted them to bit of PVDF membrane.

アンモニウムと 25 mM CaCl<sub>2</sub>を含む pH 7.8 の反応液中に酵素：基質 (mol : mol) が 1 : 50 となるように溶解したエンドプロテイナーゼ Asp-N により 40℃ で 24 時間行うことにより行った。この消化産物を回収してフィルターにかけ、凍結乾燥した。1% (V/V) アセトニトリルを含む移動相 A (0.06% (V/V) トリフルオロ酢酸 (TFA)) 18  $\mu$ l にこの凍結乾燥物を溶解し、逆相カラム (0.3  $\times$  150 mm) でキャピラリー HPLC を行った。ペプチドの溶出は流速 3.3  $\mu$ l/min、100 分間で 2% ~ 100% までの移動相 B (0.052% TFA を含む 80% アセトニトリル) の濃度勾配により行った。ペプチドの画分は 214 nm の吸光度をモニターしながら手作業で回収し、PVDF 膜の小片にブロットした。アミノ酸配列決定はモデル 476A プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) で行った。表 1 に結果を示す。

【0054】

[0054]

【表 1】

[TABLE 1]

| Peptide number | Amino acid sequence |
|----------------|---------------------|
|----------------|---------------------|

|               | Sequence number   |
|---------------|-------------------|
| ペプチド番号        |                   |
| アミノ酸配列        | 配列                |
| 番号            |                   |
|               |                   |
|               |                   |
|               |                   |
| 1             | 1 DLCAKNRYHVLHI 5 |
| DLCAKNRYHVLHI | 2 DQVRFVKNI 6     |
| 5             | 3 DXYRPGLXR 7     |
| 2             | 4 DIVIXYNR 8      |
| DQVRFVKNI     |                   |
| 6             |                   |
| 3             |                   |
| DXYRPGLXR     |                   |
| 7             |                   |
| 4             |                   |
| DIVIXYNR      |                   |
| 8             |                   |
| 5             | 5 DLYR 9          |
| DLYR          |                   |
| 9             |                   |
|               |                   |
|               |                   |
|               |                   |

## 【0055】

<2>HS2ST部分cDNA  
のPCRによる増幅

(1) PCR用プライマーの作  
成

上記ペプチドの1と2に基づい  
て、図1に示すデオキシイノシ  
ン置換を有する末端および内部

## [0055]

Amplification by PCR of <2>HS2 ST-segment  
cDNA

(1) Creation of the primer for PCR

Based on 1 and 2 of the above-mentioned  
peptide, it made terminal which has deoxy  
inosine substitution shown in FIG. 1, and  
degeneracy oligonucleotide of internal primer

のプライマーの縮重オリゴヌクレオチドを作成した（鋳型DNA配列を持つプライマー1s（配列番号10）、1si（配列番号11）、鋳型の相補的配列を持つプライマー2a（配列番号12）、2ai（配列番号13））。

## 【0056】

## (2) PCR反応

CHO細胞からオリゴdT（oligo-(dT)）セルロースクロマトグラフィーを使用する常法により採取したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを逆転写反応の鋳型として、オリゴdTをプライマーとしてcDNAの一本鎖を合成し、これをPCRの鋳型として使用した。PCRは、1μMの末端プライマー1sと2aの混合物（又は1siと2ai）、2μlの逆転写反応液、それぞれ200μMの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、および1.25UのAmpliTaqポリメラーゼ（パーキン・エルマー（Perkin-Elmer）製）を含む混合液50μlで行った。増幅は以下のように行った。はじめの3サイクルでは解離反応は94℃で1分、アニーリングは60℃で2分、伸長反応は72℃で2分とし、3サイクルごとに50℃までアニーリングの温度のみを2℃ずつ低くし、最終的にはアニーリングの温度が48℃

## [0056]

## (2) PCR reaction

It makes Oligo dT into primer for poly (A)<sup>+</sup> RNA collected by conventional method which uses oligo dT (oligo-(dT)) cellulose chromatography from CHO cell as a casting mould of reverse transcription reaction, and compounds single strand of cDNA, it used this as a casting mould of PCR.

PCR is mixture (or 1 si 2 ai(s)) of terminal primers 1s and 2a of 1 micronM, reverse transcription reaction mixture of 2 microliter, and deoxy nucleotide triphosphate that is each four kinds of 200 micronM, and

It carried out by mixed-liquid 50 microliter including AmpliTaq polymerase (product made from Perkin Elmer (Perkin-Elmer)) of 1.25U.

It performed amplification as follows.

With 3 cycles of start

It makes dissociative reaction into 1 minute at 94 degrees C, it makes annealing into 2 minutes at 60 degrees C, it makes elongation reaction into 2 minutes at 72 degrees C, every 3 cycles, it made low only 2 degrees C only of temperature of annealing at a time to 50 degrees C, and, eventually temperature of annealing performed 17 cycles on conditions which are 48 degrees C.

の条件で17サイクル行った。その後、さらに15分間伸長反応を行った。この操作によって生じた増幅物質をアガロースゲル電気泳動により解析すると、増幅された約90bpのDNAのバンドが検出された。1sと2aよりも3'末端よりそれぞれ9bpと3bpシフトしているプライマー1siと2siを利用してPCRを行った結果でも、ほぼ同じ大きさのDNA断片が生じた。

## 【0057】

<3>チャイニーズハムスターのHS2ST完全長cDNAの取得

(1) ハイブリダイゼーション用プローブの作成

1sと2aをプライマーとしてPCRを行って得られたDNA断片はJetsorb (ゲノメッド(Genomed)製) を使って回収した。T4 DNAポリメラーゼを使い平滑化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化したこのDNAを、アルカリホスファターゼ処理をしたブルースクリプト(Bluescript)プラスミド (ストラタジーン(Stratagene)製) DNAのEcoRV消化断片と結合し、JM109を用いて、青と白の色による選択によりサブクローン化した。サブクローンは配列決定に

After that, moreover, it performed elongation reaction for 15 minutes.

When amplification substance produced by this operation was analyzed according to agarose gel electrophoresis, band of DNA of about 90 amplified bp(s) was detected.

Even result of having performed PCR using primer 1si which is alike from 3' terminal and is each making 3bp shift with 9bp(s) rather than 1s and 2a, and 2si(s), DNA fragment of nearly identical size occurred.

## [0057]

<3> Acquisition of HS2ST perfect length cDNA of Chinese hamster

(1) Creation of the probe for hybridization

DNA fragment which were obtained by carrying out collected PCR using Jetsorb (product made from Genomed (Genomed)) by making 1s and 2a into primer.

T4 It smooths using the DNA polymerase, it connects this DNA phosphorylated by T4 polynucleotide kinase with EcoRV digestive fragment of bluescript (Bluescript) plasmid (product made from Stratagene (Stratagene)) DNA which made alkaline-phosphatase treatment, it subclone-ized by selection by color of blue and white using JM109.

It checked the subclone by the sequencing.

より確認した。

#### 【0058】

cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した放射線ラベルしたプローブは、プライマー 1s および 2a、鋳型としてサブクローン化された約 90 bp の DNA、ならびに  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (アマシャム(Amersham) 製) を含む最終量  $25\text{ }\mu\text{l}$  の溶液で増幅した PCR 産物から調製した。PCR は、 $94^{\circ}\text{C}$  で 1 分、 $48^{\circ}\text{C}$  で 1 分、 $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分のサイクルを 35 回繰り返し、最終のサイクルではさらに  $72^{\circ}\text{C}$  での伸長時間を 15 分延長することにより行った。

#### 【0059】

(2) HS2STcDNA クローンのスクリーニング  
CHO 細胞の cDNA ライブラリーである Lambda ZAP cDNA ライブラリーをストラタジーンから購入した。宿主の E. coli XL-1 Blue 細胞にライブラリーのファージを感染させた。プレート 1 枚当たり  $2\sim 4\times 10^4$  個のプラークが形成されるようにまき、約  $1.4\times 10^6$  個のコロニーをスクリーニングした。Uni-ZAP XR ライブラリーから生じたコロニーを転写した Hybond N+ ナイロン膜をア

#### [0058]

It subclones probe which was used for screening of cDNA library and which made radiation label as Primers 1s and 2a and a casting mould.

It prepared from PCR production amplified with DNA of about 90 bp(s) which turned, and solution of final quantity 25 microliter including  $[(\alpha)\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (product made from Amersham (Amersham)).

By  $94^{\circ}\text{C}$ , it repeated at  $48^{\circ}\text{C}$  for 1 minute for 1 minute, it repeated cycle of 1 minute 35 times at  $72^{\circ}\text{C}$ , and, moreover, PCR performed it by extending  $72^{\circ}\text{C}$  elongation time for 15 minutes in the final cycle.

#### [0059]

(2) It purchased from Stratagene Lambda ZAP cDNA library which is cDNA library of screening CHO cell of HS2STcDNA clone.

It infected phage of library with host's E.coli XL-1 Blue cell.

It would so that plaque of  $2\sim 4\times 10^4$  might be formed per plate, and it screened colony of approximately  $1.4\times 10^6$ .

It fixes the Hybond N+ nylon film which transferred the colony produced from the Uni-ZAP XR library by the alkali anchorage, it pre hybridized at  $45^{\circ}\text{C}$  for 3.5 hours among 37.5% formamide, 5\*SSPE (sodium chloride / sodium phosphate / EDTA buffer), 5\*Denhard's solution, and the solution that contains SDS and denatured 50



ルカリ固定法により固定し、3  
7. 5%ホルムアミド、5×S  
SPE (塩化ナトリウム/リン  
酸ナトリウム/EDTA緩衝  
液)、5×Denhard's solution、  
0.5% SDSと50 μg/  
mlの変性させたサケ精子DN  
Aを含む溶液中、45℃で3.  
5時間プレハイブリダイズし  
た。<sup>32</sup>Pラベルしたプローブを  
上記バッファー中に加え、4  
2℃で16時間ハイブリダイズ  
した。フィルターを、55℃で  
1×SSPE、1% SDS、  
さらに0.1×SSPE、0.  
1% SDSにより洗浄し、オ  
ートラジオグラフィーにより6  
個の陽性クローンを検出した。

## 【0060】

(3) チャイニーズハムスター  
由来のHS2STcDNAの塩  
基配列  
陽性クローンからのブルースク  
リプトプラスミドを、ExAss  
sistヘルパーファージと  
E.coli SOLRを使用す  
るストラタジーンのin vi  
vo DNA切り出し法  
(Stratagene in vivo excision  
protocol)により切り出した。S  
OLRに導入されたブルースク  
リプトプラスミドDNAをQI  
AGENプラスミドキットを用  
いて精製した。導入されたcD  
NAのうち、最も長い2.2k

microgram(s)/ml salmon sperm DNA 0.5%.

<sup>32</sup>P It added the probe which carried out the  
label into the above-mentioned buffer, and  
hybridized at 42 degrees C for 16 hours.

About a filter, it is 55 degrees C, and they are  
1×SSPE and 1% SDS, furthermore, 0.1×SSPE  
and 0.1% SDS wash, autoradiography detected  
six positive clones.

## [0060]

(3) The base sequence of HS2STcDNA derived  
from a Chinese hamster

Bluescript from a positive clone It cut the  
plasmid out by the in-vivo DNA cut-off method  
(Stratagene in-vivo excision protocol) of the  
Stratagene which uses the ExAssist helper  
phage and E.coli SOLR.

It refined the bluescript plasmid DNA  
transduced into SOLR using the QIAGEN  
plasmid kit.

It determined the base sequence of cDNA  
named K3 and H8 of longest 2.2kbp(s) among  
transduced cDNA(s).

It confirmed the base sequence using the  
Séquenase version 2.0 (respectively product  
made from U.S. biochemical (Biochemical)) of a

b p の K 3 と H 8 と名付けた c DNA の塩基配列を決定した。塩基配列は d G T P / d e a z a G T P キットと同封の Sequenase バージョン 2. 0

(それぞれ U.S. バイオケミカル(Biochemical)製)を使用して確かめた。T 3 DNA ポリメラーゼ、T 7 DNA ポリメラーゼにより DNA 合成を開始し、約 250 b p の位置に内部プライマーが挿入された。得られた DNA はコンピュータソフトウェアのジェネティックス-マック (GENETYX-MAC: ソフトウェアデベロプメント社製) により編集、解析した。その結果、K 3 から得られた c DNA が H 8 から得られた全配列を含み、HS 2 S T をコードする全領域を含むことが明らかになり、この配列からコードされたアミノ酸配列を予測した (配列番号 1)。アミノ末端の配列に 4 つのイン・フレームの A T G コドンが含まれた。最初の A T G コドンの上流域 - 21 の場所に終止コドンの T G A 配列が存在した。最初の A T G コドンから開始するオープンリーディングフレームは 356 アミノ酸残基の 41, 830 D a で 2 カ所の糖結合可能域を持つタンパク質が予想された。このアミノ酸配列のハイドロパシープロットにより、HS 2 S T アミノ末端領域の 14 番

dGTP/deazaGTP kit and enclosure.

T3 The DNA polymerase and T7 It starts DNA composition by the DNA polymerase, the internal primer was inserted in the position of about 250 bp(s).

It edited and analyzed obtained DNA with the genetics-Mac (GENETYX-MAC: made by Software Development) of computer software.

As a result, it becomes clear that cDNA obtained from K3 includes the four corners which code HS2ST including all the sequences obtained from H8, it estimated the amino acid sequence coded from this sequence (sequence number 1).

The ATG codon of four in frames was contained in the sequence of an amino terminus.

The TGA sequence of the termination codon existed in the place of the upper region -21 of the first ATG codon.

The protein in which the open reading frame which it starts from the first ATG codon has two saccharide combinable regions by 41,830Da(s) of 356 amino acid residues was expected.

By the hydropathy plot of this amino acid sequence, 14 amino acid residues from the 14th of HS2ST amino terminal region to the 27th are clear

It became clear that it was the hydrophobic region (FIG. 2).

It compared the amino acid sequence expected to be a base with the base sequence of DNA and protein database (the EMBL-GDB release 44 and NBRF-PDB release 45) which code other protein.

As a result, the known sulfuric-acid group transferases and homology other except that

目から27番目までの14アミノ酸残基が明確な疎水領域であることが判明した(図2)。塩基と予想されるアミノ酸配列を他のタンパク質をコードするDNAの塩基配列とタンパク質データベース(EMBL-GDB リリース44とNBRF-PDB リリース45)と比較した。その結果、ニワトリのコンドロイチン6-硫酸基転移酵素のアミノ酸番号179～183に存在するDLIYLの配列がアミノ酸番号338～342に保存されている以外は他の既知の硫酸基転移酵素と相同性は認められなかった。また、硫酸基転移酵素では比較的高い確率で保存されているアリル硫酸基転移酵素IVでPAPSと親和性を示すことが報告されているGXXGXXKまたはLEKCGRの配列(Zheng, Y., Bergold, A., and Duffel, M.W. (1994) J. Biol. Chem. 269, 30313-30319)も見いだせなかった。このアミノ酸配列から、精製したタンパク質をエンドプロテイナーゼAsp-Nで処理後、エンドプロテイナーゼLys-Cで処理して際に得られた断片のアミノ酸配列が全て見つかり、このcDNAクローンは精製されたHS2STをコードするものと決定された。

the sequence of DLIYL which exists in the amino acid number 179-183 of the chondroitin 6-sulfuric-acid group transferases of a chicken is preserved for the amino acid number 338-342 were not observed.

Moreover, it is reported by the sulfuric-acid group transferases that PAPS and affinity are shown with the allyl sulfuric-acid group transferases IV preserved by comparative high probability.

It was not able to find out the sequence (Zheng, Y., Bergold, A., and Duffel, M.W.(1994) J.Biol.Chem.269, 30313-30319) of GXXGXXK which is, or LEKCGR, either.

The amino acid of the fragment which treated refined protein after treatment and by end proteinases Lys-C by end proteinases Asp-N, and was obtained from this amino acid sequence on the occasion

All sequences were found and this cDNA clone was determined as what codes refined HS2ST.

【0061】

[0061]

<4> ヒトのHS2ST完全長  
cDNAの取得

(1) HS2STcDNAクロ  
ーのスクリーニング

上記チャイニーズハムスターの  
HS2STcDNAをスクリー  
ニング用プローブをとして使用  
してヒト由来のHS2ST完全  
長cDNAのスクリーニングを  
行った。ヒト胎児脳のcDNA  
ライブラリーを組み込んだλg  
t11 cDNAライブラリー  
をクロンテックから購入した。  
宿主のE. coli Y1088  
細胞にライブラリーのファージ  
を感染させた。プレート1枚当  
たり2~4×10<sup>4</sup>個のプラーク  
が形成されるようにまき、約  
1.0×10<sup>6</sup>個のコロニーをス  
クリーニングした。λgt11  
が組み込まれて生じたコロニー  
を転写したHybondN+ナ  
イロン膜をアルカリ固定法によ  
り固定し、37.5%ホルムア  
ミド、5×SSPE (塩化ナト  
リウム/リン酸ナトリウム/E  
DTA緩衝液)、5×Denhard's  
solution、0.5% SDSと5  
0 μg/mlの変性させたサケ  
精子DNAを含む溶液中、4  
2℃で3.5時間プレハイブリ  
ダイズした。<sup>32</sup>Pラベルしたプ  
ローブを上記バッファー中に加  
え、42℃で16時間ハイブリ  
ダイズした。フィルターを、4  
5℃で1×SSPE、1% S

<4> Acquisition of the human HS2ST perfect  
length cDNA

(1) It used it in the probe for a screening by  
carrying out HS2STcDNA of the screening  
above-mentioned Chinese hamster of a  
HS2STcDNA clone, and performed the  
screening of the HS2ST perfect length cDNA  
derived from a human.

It purchased the (lambda)gt11 cDNA library  
incorporating the cDNA library of a human fetus  
brain from Clontech.

It infected the phage of a library with the host's  
E.coli Y1088 cell.

It wound so that the plaque of 2-4×10<sup>4</sup> might  
be formed per plate, and it screened the colony  
of approximately 1.0×10<sup>6</sup>.

It fixes the HybondN+ nylon film which  
transferred the colony which (lambda) gt11 was  
integrated and was produced by the alkali  
anchorage, it pre hybridized at 42 degrees C for  
3.5 hours among 37.5% formamide, 5×SSPE  
(sodium chloride / sodium phosphate / EDTA  
buffer), 5×Denhard's solution, and the solution  
that contains SDS and denatured 50  
microgram(s)/ml salmon sperm DNA 0.5%.

It added the probe which the <sup>32</sup>P label carried  
out into the above-mentioned buffer, and  
hybridized at 42 degrees C for 16 hours.

About a filter, it is 45 degrees C, and they are  
1×SSPE and 1% SDS, furthermore, 0.1×SSPE  
and 0.1% SDS wash, autoradiography detected  
seven positive clones.

DS、さらに0.1×SSPE、  
0.1% SDSにより洗浄し、  
オートラジオグラフィーにより  
7個の陽性クローンを検出し  
た。

## 【0062】

(2) HS2STcDNAの塩基配列  
陽性クローンからのブルースクリプトプラスミドを、ExAssistヘルパーファージとE.coli SOLRを使用するストラタジーンのin vivo DNA切り出し法(Stratagene in vivo excision protocol)により切り出した。SOLRに導入されたブルースクリプトプラスミドDNAをQIAGENプラスミドキットを用いて精製し、cDNAの塩基配列を決定した。塩基配列はdGTP/deazaGTPキットと同封の Sequenase バージョン2.0 (それぞれU.S.バイオケミカル(Biochemical)製)を使用して確かめた。T3 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼによりDNA合成を開始した。得られたDNAはコンピュータソフトウェアのジェネティックスマック(GENETYX-MAC:ソフトウェアデベロプメント社製)により編集、解析した。その結果、ヒト由来のHS2STをコードする

## [0062]

(2) The base sequence of HS2STcDNA

Bluescript from a positive clone It cut the plasmid out by the in-vivo DNA cut-off method (Stratagene in-vivo excision protocol) of the Stratagene which uses the ExAssist helper phage and E.coli SOLR.

It refines the bluescript plasmid DNA transduced into SOLR using a QIAGEN plasmid kit, it determined the base sequence of cDNA.

It confirmed the base sequence using the Sequenase version 2.0 (respectively product made from U.S. biochemical (Biochemical)) of a dGTP/deazaGTP kit and enclosure.

T3 The DNA polymerase and T7 It started DNA composition by the DNA polymerase.

It edited and analyzed obtained DNA with the genetics-Mac (GENETYX-MAC: made by Software Development) of computer software.

As a result, the all-domain base sequence which codes HS2ST derived from a human becomes clear, it estimated the amino acid sequence coded from this sequence (sequence number 3).

The ATG codon of four in frames was contained in the sequence of an amino terminus.

The TGA sequence of the termination codon existed in the place of the upper region -21 of the first ATG codon.

The protein in which the open reading frame

全領域の塩基配列が明らかになり、この配列からコードされたアミノ酸配列を予測した（配列番号3）。アミノ末端の配列に4つのイン・フレームのATGコドンが含まれた。最初のATGコドンの上流域-21の場所に終止コドンのTGA配列が存在した。最初のATGコドンから開始するオープンリーディングフレームは356アミノ酸残基の41868Daで2カ所の糖結合可能域を持つタンパク質が予想された。このアミノ酸配列のハイドロパシープロットにより、HS2STアミノ末端領域の14番目から27番目までの14アミノ酸残基が明確な疎水領域であることが判明した。塩基と予想されるアミノ酸配列を上記チャイニーズハムスター由来のcDNA及びそれがコードするHS2STと比較した。その結果、ヒト由来のHS2STはチャイニーズハムスター由来のHS2STと97.5%の相同性を有することが明らかとなった（図3）。

#### 【0063】

<5>HS2STcDNAの発現

(1) HS2ST発現プラスミドの構築

HS2STcDNAを発現させるために、発現ベクターにcD

which it starts from the first ATG codon has two saccharide combinable regions by 41868Da(s) of 356 amino acid residues was expected.

By the hydropathy plot of this amino acid sequence, it became clear that 14 amino acid residues from the 14th of HS2ST amino terminal region to the 27th were clear hydrophobic region.

It compared the amino acid sequence expected to be a base with HS2ST which cDNA and it derived from the above-mentioned Chinese hamster code.

As a result, it became clear that HS2ST derived from a human has HS2ST and 97.5% of homology derived from a Chinese hamster (FIG. 3).

#### [0063]

The expression of <5>HS2STcDNA

(1) An assembly of a HS2ST expression plasmid

In order to let HS2STcDNA express, it inserts a cDNA fragment in an expression vector, it built the recombinant plasmid.

NA断片を挿入し、組換えプラスミドを構築した。単離したcDNAを哺乳動物の発現ベクターpcDNA3に導入した組換えプラスミドであるpcDNA3HS2STを構築した。

It built pcDNA3HS2ST which is the recombinant plasmid which transduced isolated cDNA into the expression vector pcDNA3 of a mammal.

## 【0064】

(2) COS-7細胞中でのHS2STcDNAのトランジェント(一過性)な発現  
HS2STcDNAの発現の宿主にはCOS-7細胞を用いた。

## [0064]

(2) The expression with transient (transience) HS2STcDNA in COS-7 cell  
It used COS-7 cell for the host of an expression of HS2STcDNA.

## 【0065】

pcDNA3HS2STをトランスフェクトした細胞を67時間培養し、この細胞からKobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653に記載の方法に従って細胞抽出液を調製した。この細胞抽出液を30分間4℃、10,000×gで遠心処理した後、上清画分のHS2ST、HS6ST、コンドロイチンO-硫酸基転移酵素(COST)活性を調べた。対照としてcDNAを含まないpcDNA3をトランスフェクトしたCOS-7細胞と何もトランスフェクトしないCOS-7細胞を用いた。単離したチャイニーズハムスター由来のcDNAを含

## [0065]

It cultures the cell which transfected pcDNA3HS2ST for 67 hours, this cell to Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653, it prepared the cell extract.  
After carrying out centrifugation treatment of this cell extract by 4 degrees C and 10,000\*g for 30 minutes, it examined HS2ST of a supernatant-liquid fraction, HS6ST, and chondroitin O- sulfuric-acid group transferases (COST) activity.  
It used COS-7 cell which transfected pcDNA3 which does not contain cDNA as a control, and COS-7 cell which nothing transfects.  
If the vector containing cDNA derived from the isolated Chinese hamster is transfected, it will transfect no HS2ST activity.

むベクターをトランスフェクトすると、HS2ST活性は何もトランスフェクトしない対照の2.6倍に上がっていた(表2)。なお、これらの活性の測定はKobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, and K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 7645-7653 に記載の方法に従って行った。

It bent and was going up by the control 2.6 times (Table 2).

In addition, these active measurement is Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, and K. (1996) J. Biol.

Chem. 271, 7645-7653. It carried out according to the method of

【0066】

[0066]

【表2】

[TABLE 2]

Sulfuric-acid group transferases activity

硫酸基転移酵素活性

| HS6ST<br>COST | HS2ST     | HS2ST HS6ST COST                             |
|---------------|-----------|----------------------------------------------|
|               |           | Control 2.2 +/-0.5 1.7 +/-0.5 6.4 +/-0.1     |
|               |           | PcDNA3 2.2 +/-0.1 1.9 +/-0.3 6.7 +/-0.5      |
| 対照            | 2.2 ± 0.5 |                                              |
| 1.7 ± 0.5     | 6.4 ±     |                                              |
| 0.1           |           |                                              |
| pcDNA3        | 2.2 ± 0.1 |                                              |
| 1.9 ± 0.3     | 6.7 ± 0.5 |                                              |
| pcDNA3HS2ST   | 5.7 ± 0.7 | PcDNA3HS2ST 5.7 +/-0.7 1.6 +/-0.4 7.0 +/-0.1 |



1.6±0.4

7.0±0.1

-----  
 \* The unit of the numerical value in a table is  
 pmol/min/mg protein.

\* 表内の数値の単位は  
 pmol/min/mg protein

## 【0067】

表で示したように、上記で単離された cDNA を発現させるベクターを保持する細胞の HS2ST 活性は対照と cDNA を保持しないプラスミドを導入した細胞の約 2.5 倍であった。これに対して HS6ST 活性および COST 活性の増加は起こらなかった。これらの結果から、単離された cDNA が HS2ST 活性を持つタンパク質をコードしていることが証明された。また、ヒト由来の HS2ST の cDNA を用いて上記と同様に COS-7 細胞にトランスフェクションしてヒト由来の HS2ST を発現させた。その結果、チャイニーズハムスターの HS2ST を発現させた際と同様の結果が得られ、ヒト由来の HS2ST の cDNA がチャイニーズハムスター由来の HS2ST と同様の活性を有する HS2ST をコードしていることが明らかとなった。

## [0067]

As the table showed, the HS2ST activity of the cell holding the vector which lets cDNA isolated above express was about 2.5 times the cell which transduced the plasmid which does not hold a control and cDNA.

On the other hand, the increase in HS6ST activity and COST activity did not take place.

It was proved that isolated cDNA is coding protein with HS2ST activity from these results.

Moreover, it transfected into COS-7 cell in the same manner to the above using cDNA of HS2ST derived from a human, and let HS2ST derived from a human express.

As a result, a result similar to when it lets HS2ST of a Chinese hamster express is obtained, it became clear that cDNA of HS2ST derived from a human is coding HS2ST which has the activity similar to HS2ST derived from a Chinese hamster.

## 【0068】

<6>チャイニーズハムスター

## [0068]

<6> It is poly (A)<sup>+</sup> RNA extracted from the

卵巣細胞ポリ(A)<sup>+</sup>RNAのノザンブロットによるHS2ST発現の解析

チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞株CHOから抽出したポリ(A)<sup>+</sup>RNAをpH7.0の50%ホルムアミド(V/V)、6%ホルムアルデヒド(V/V)、20mM MOPSバッファで65℃、10分間変性し、6%ホルムアルデヒド(V/V)を含む1.2%アガロースゲルで電気泳動を行った。50mMのNaOHで20分間処理した後、20×SSC(酢酸ナトリウム/塩化ナトリウム緩衝液)で45分間中和し、ゲル中のRNAをHybond-N<sup>+</sup>ナイロン膜に一晩転写し、50mMのNaOHで5分間固定した。膜上に固定されたRNAを42℃で3時間、50%ホルムアルデヒド、5×SSPE、5×Denhardt's solution、0.5% SDS、100μg/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中でプレハイブリダイズした。ハイブリダイズは<sup>32</sup>Pラベルしたプローブ(1×10<sup>6</sup>cpm/ml)を含む上記緩衝液で行った。放射線ラベルしたプローブはブルースクリプトに挿入されたK3クローンをSmaIとAflIIで消化して得られた配列番号1における塩基番号113~1,257間の1,1

analysis Chinese hamster ovary origin culture cell strain CHO of the HS2ST expression by the northern blot of Chinese hamster ovarian-cell poly(A)<sup>+</sup> RNA pH7.0 50% Formamide (V/V) and 6% 65 degrees C modifies for 10 minutes by formaldehyde (V/V) and 20 mM MOPS buffer, and it is 6%. It performed the electrophoresis by 1.2% agarose gel containing formaldehyde (V/V).

After treating for 20 minutes by 50 mM NaOH, it harmonized throughout for 45 minutes by 20×SSC (sodium acetate / sodium chloride buffer), transferred RNA in the gel on the Hybond-N<sup>+</sup> nylon film overnight, and fixed for 5 minutes by 50 mM NaOH.

It is RNA fixed on the film at 42 degrees C 3 hours and 50% It pre hybridized in formaldehyde, 5×SSPE, 5×Denhardt's solution, and the solution that contains SDS and denatured 100 microgram/ml salmon sperm DNA 0.5%.

The above-mentioned buffer containing probe (1×10<sup>6</sup>cpm/ml) which the <sup>32</sup>P label carried out performed hybridization.

The probe which carried out the radiation label is to sequence number 1 obtained by digesting K3 clone inserted in bluescript by SmaI and AflII.

It uses [(alpha)-<sup>32</sup>P] dCTP and a Ready-To-Go DNA labeling kit (Pharmacia Biotech (Pharmacia Biotech)) from the DNA fragment which is made up of 1,145 bases between the base numbers 113-1,257 which can be set, and is random oligonucleotide-prime. It made by the labeling (Random oligonucleotide-primed labeling) method.

45塩基からなるDNA断片から $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ とReady-To-Go DNAラベリングキット(ファルマシア バイオテック(Pharmacia Biotech))を使用してランダムオリゴヌクレオチドプライム ラベリング

(Random oligonucleotide-primed labeling)法により作成した。この膜は65℃で1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄した後、同温度で0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄した。この膜を-80℃で14時間、増感膜を用いてX線フィルムに感光させた。その結果、5.0kbと3.0kbの2つのバンドが得られた。

By 65 degrees C, 1×SSPE and after SDS washed 0.1%, 0.1×SSPE and 0.1% SDS washed this film at the same temperature. It let the X ray film photosensitize this film for 14 hours using a sensitizing film at -80 degrees C. As a result, two bands, 5.0kb and 3.0kb(s), were obtained.

【0069】

## 【発明の効果】

本発明により、ヘパラン硫酸に含まれるL-イズロン酸残基の2位の水酸基に硫酸基を選択的に転移するヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素(HS2ST)のポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有するDNAが得られる。また更に該DNA由来のDNA断片から発現されるポリペプチドが得られる。

【0070】

[0069]

## [ADVANTAGE OF THE INVENTION]

DNA which has the base sequence which codes the polypeptide of the heparan-sulfate 2-O-sulfuric-acid group transferases (HS2ST) and it which transfer a sulfuric-acid group to the hydroxyl group of 2-position of L- iduronic-acid residue contained in a heparan sulfate alternatively by this invention is obtained.

Also

Furthermore, the polypeptide which expresses from the DNA fragment derived from this DNA is obtained.

[0070]

本発明により、HS2STのポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAが得られたので、HS2STを工業的に使用可能な程度まで大量生産できることが期待される。

DNA which has the base sequence which codes the polypeptide of HS2ST by this invention was obtained, therefore, it is expected that it can mass-produce to the degree which can use HS2ST industrially.

## 【0071】

## [0071]

## 【配列表】

## [SEQUENCE TABLE]

配列番号 : 1

Sequence number: 1

配列の長さ : 2138

Sequence length: 2138

配列の型 : 核酸

Sequence type: Nucleic acid

鎖の数 : 両形態

The number of strands: Car form

トポロジー : 直鎖状

Topology: Linear

配列の種類 : cDNA

Type of sequence: cDNA

起原

Origin

生物名 : チャイニーズハムスター

Organism name: Chinese hamster

The kind of tissue: Ovary

組織の種類 : 卵巣

Sequence characteristics

配列の特徴

The symbol showing the characteristics: CDS

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 24..1091

Location: 24.1091

特徴を決定した方法 : P

Method: P which determined the characteristics

配列の特徴

Sequence characteristics

特徴を示す記号 :  
transmembrane domainThe symbol which shows the characteristics:  
transmembrane domain

存在位置 : 63..104

Location: 63.104

特徴を決定した方法 : P

Method: P which determined the characteristics

配列の特徴

Sequence characteristics

特徴を示す記号 : potential  
N-glycosylation siteThe symbol which shows the characteristics:  
potential N-glycosylation site

存在位置 : 345..353

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴

特徴を示す記号 : potential

N-glycosylation site

Location: 345.353

Method:S which determined the characteristics

Sequence characteristics

The symbol which shows the characteristics:

potential N-glycosylation site

存在位置 : 403..410

特徴を決定した方法 : S

配列

CTTGATCTCC

AGCCGCGGGT TTC ATG

GGG CTC CTC AGG ATC ATG

ATG CCG 50

Location: 403.410

Method:S which determined the characteristics

Sequence

CTTGATCTCC AGCCGCGGGT TTC ATG

GGG CTC CTC AGG ATC ATG ATG CCG 50

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met

Met Pro

1

5

CCC AAG TTG CAG CTG CTG

GCG GTG GTG GCC TTC

GCC GTG GCG ATG CTC

98

Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met

Leu

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro

1 5

CCC AAG TTG CAG CTG CTG GCG GTG

GTG GCC TTC GCC GTG GCG ATG CTC 98

Pro Lys Leu Gln Leu Leu Ala Val Val Ala Phe

Ala Val Ala Met Leu

10

15 10 15 20 25

20

25

TTC TTG GAG AAC CAG ATC

CAG AAG CTG GAG GAG

TCC CGG GCG AAG CTA

146

Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ala

TTC TTG GAG AAC CAG ATC CAG AAG CTG

GAG GAG TCC CGG GCG AAG CTA 146

Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln Lys Leu Glu Glu

Ser Arg Ala Lys Leu

30 35 40

Lys Leu

30  
35 40

GAA AGG GCA ATC GCA AGA GAA AGG GCA ATC GCA AGA CAT GAA GTC  
CAT GAA GTC CGG GAA ATT CGG GAA ATT GAA CAG CGG CAT 194  
GAA CAG CGG CAT 194 Glu Arg Ala Ile Ala Arg His Glu Val Arg Glu Ile  
Glu Arg Ala Ile Ala Arg His Glu Glu Gln Arg His  
Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His 45 50 55  
45 ACA ATG GAT GGC CCT CGG CAA GAT GCG  
50 55 GCT GTA GAT GAA GAA GAA GAT 242  
ACA ATG GAT GGC CCT CGG  
CAA GAT GCG GCT GTA GAT  
GAA GAA GAA GAT 242

Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln Asp Ala Ala Val  
Asp Ala Ala Val Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp  
Asp 60 65 70  
60 ATA GTC ATC ATT TAT AAC AGA GTT CCC  
65 70 AAA ACT GCA AGC ACC TCG TTT 290  
ATA GTC ATC ATT TAT AAC Ile Val Ile Ile Tyr Asn Arg Val Pro Lys Thr Ala Ser  
AGA GTT CCC AAA ACT GCA Thr Ser Phe  
AGC ACC TCG TTT 290  
Ile Val Ile Ile Tyr Asn Arg Val  
Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser  
Phe

75 80 75 80 85  
85 ACC AAT ATC GCC TAT GAC TTG TGT GCG  
ACC AAT ATC GCC TAT GAC AAG AAT AGA TAC CAT GTT CTT 338  
TTG TGT GCG AAG AAT AGA Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg  
TAC CAT GTT CTT 338 Tyr His Val Leu  
Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu Cys 90 95 100 105  
Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu  
90 95  
100 105

CAC ATC AAC ACT ACC AAA CAC ATC AAC ACT ACC AAA AAC AAC CCA  
AAC AAC CCA GTG ATG TCA GTG ATG TCA TTG CAA GAT CAG 386  
TTG CAA GAT CAG 386 His Ile Asn Thr Thr Lys Asn Asn Pro Val Met Ser  
His Ile Asn Thr Thr Lys Asn Asn Leu Gln Asp Gln  
Pro Val Met Ser Leu Gln Asp 110 115 120  
Gln GTA CGC TTT GTA AAG AAT ATA ACC ACT  
115 120 TGG AAC GAG ATG AAA CCA GGG 434  
GTA CGC TTT GTA AAG AAT  
ATA ACC ACT TGG AAC GAG  
ATG AAA CCA GGG 434

Val Arg Phe Val Lys Asn Ile Thr Val Arg Phe Val Lys Asn Ile Thr Thr Trp Asn Glu  
Thr Trp Asn Glu Met Lys Pro Met Lys Pro Gly  
Gly 125 130 135  
125 TTT TAT CAT GGA CAC ATT TCT TAT CTG  
130 135 GAT TTT GCAAAA TTC GGT GTG 482  
TTT TAT CAT GGA CAC ATT Phe Tyr His Gly His Ile Ser Tyr Leu Asp Phe Ala  
TCT TAT CTG GAT TTT GCA Lys Phe Gly Val  
AAATTC GGT GTG 482  
Phe Tyr His Gly His Ile Ser Tyr  
Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly  
Val

140 140 145 150  
145 150 AAG AAG AAG CCC ATT TAC ATT AAT GTC  
AAG AAG AAG CCC ATT TAC ATC AGG GAC CCT ATC GAG AGG 530  
ATT AAT GTC ATC AGG GAC Lys Lys Lys Pro Ile Tyr Ile Asn Val Ile Arg Asp  
CCT ATC GAG AGG 530 Pro Ile Glu Arg  
Lys Lys Lys Pro Ile Tyr Ile Asn 155 160 165  
Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg  
155 160  
165

CTT GTT TCC TAC TAT TAC CTT GTT TCC TAC TAT TAC TTT CTG AGG

TTT CTG AGG TTT GGG GAT TTT GGG GAT GAT TAC AGA CCA 578  
 GAT TAC AGA CCA 578 Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu Arg Phe Gly  
 Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu Asp Asp Tyr Arg Pro  
 Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg 170 175 180 185  
 Pro GGA TTA AGG AGA CGG AAA CAA GGA GAC  
 170 175 AAAAAG ACC TTT GAT GAA TGT 626  
 180 185  
 GGA TTA AGG AGA CGG AAA  
 CAA GGA GAC AAA AAG ACC  
 TTT GAT GAA TGT 626

Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln Gly Leu Arg Arg Arg Lys Gln Gly Asp Lys Lys  
 Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Thr Phe Asp Glu Cys  
 Glu Cys 190 195 200  
 190 195 200 GTG GCT GAG GGC GGC TCA GAC TGT  
 GCT CCG GAG AAG CTC TGG CTC CAG 674  
 GTG GCT GAG GGC GGC Val Ala Glu Gly Gly Ser Asp Cys Ala Pro Glu Lys  
 TCA GAC TGT GCT CCG GAG Leu Trp Leu Gln  
 AAG CTC TGG CTC CAG  
 674  
 Val Ala Glu Gly Gly Ser Asp  
 Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp  
 Leu Gln

205 205 210 215  
 210 215 ATC CCA TTT TTC TGT GGC CAC AGC TCA  
 ATC CCA TTT TTC TGT GGC GAA TGC TGG AAT GTG GGAAGC 722  
 CAC AGC TCA GAA TGC TGG Ile Pro Phe Phe Cys Gly His Ser Ser Glu Cys  
 AAT GTG GGAAGC 722 Trp Asn Val Gly Ser  
 Ile Pro Phe Phe Cys Gly His 220 225 230  
 Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val  
 Gly Ser  
 220  
 225 230

AGA TGG GCT ATG GAT CAA AGA TGG GCT ATG GAT CAA GCT AAG TAT



GCT AAG TAT AAC CTC ATT AAC CTC ATT AAC GAG TAC TTT 770  
 AAC GAG TAC TTT 770 Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala Lys Tyr Asn Leu Ile  
 Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala Lys Asn Glu Tyr Phe  
 Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe 235 240 245  
 235 240 CTG GTG GGA GTT ACT GAG GAG CTG GAA  
 245 GAC TTC ATC ATG CTA CTC GAG 818  
 CTG GTG GGA GTT ACT GAG  
 GAG CTG GAA GAC TTC ATC  
 ATG CTA CTC GAG 818

Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Leu Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Leu Glu Asp Phe Ile  
 Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Met Leu Leu Glu  
 Glu 250 255 260 265  
 250 255 GCA GCT TTG CCC CGG TTT TTC CGG GGT  
 260 265 GCT ACA GAC CTC TAT CGT ACA 866  
 GCA GCT TTG CCC CGG TTT Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe Arg Gly Ala Thr  
 TTC CGG GGT GCT ACA GAC Asp Leu Tyr Arg Thr  
 CTC TAT CGT ACA 866  
 Ala Ala Leu Pro Arg Phe Phe  
 Arg Gly Ala Thr Asp Leu Tyr Arg  
 Thr

270 270 275 280  
 275 280 GGA AAG AAA TCC CAC CTG AGG AAA ACC  
 GGA AAG AAA TCC CAC CTG ACA GAG AAG AAA CTT CCC ACC 914  
 AGG AAA ACC ACA GAG AAG Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Lys Thr Thr Glu Lys  
 AAA CTT CCC ACC 914 Lys Leu Pro Thr  
 Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Lys 285 290 295  
 Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro  
 Thr

285  
 290 295  
 AAG CAA ACC ATC GCG AAG AAG CAA ACC ATC GCG AAG CTG CAG CAG  
 CTG CAG CAG TCT GAC ATT TCT GAC ATT TGG AAAATG GAA 962  
 TGG AAAATG GAA 962 Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu Gln Gln Ser Asp Ile

Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu Gln Trp Lys Met Glu  
 Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu 300 305 310  
                   300                  AAT GAG TTC TAC GAG TTT GCA CTA GAG  
 305                  310                  CAG TTC CAG TTC ATC AGA GCC 1010  
 AAT GAG TTC TAC GAG TTT  
 GCA CTA GAG CAG TTC CAG  
 TTC ATC AGA GCC 1010

Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala Leu Glu Gln Phe  
 Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Gln Phe Ile Arg Ala  
 Arg Ala 315 320 325  
                   315                  320 CAC GCT GTC CGT GAG AAA GAT GGA GAC  
 325                  CTC TAC ATC CTG GCC CAG AAC 1058  
 CAC GCT GTC CGT GAG AAA His Ala Val Arg Glu Lys Asp Gly Asp Leu Tyr Ile  
 GAT GGA GAC CTC TAC ATC Leu Ala Gln Asn  
 CTG GCC CAG AAC 1058  
 His Ala Val Arg Glu Lys Asp Gly  
 Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn

330                  335 330 335 340 345  
 340                  345 TTT TTC TAT GAA AAG ATT TAC CCG AAG  
 TTT TTC TAT GAA AAG ATT TCG AAC TGAGTGGAAG TGTGACCAGA  
 TAC CCG AAG TCG AAC 1111  
 TGAGTGGAAG Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Pro Lys Ser Asn  
 TGTGACCAGA 1111 350 355  
 Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Pro  
 Lys Ser Asn

350

355

|                       |                       |            |
|-----------------------|-----------------------|------------|
| GCAGTCTTGA ACCTGGACTT | GCAGTCTTGA            | ACCTGGACTT |
| GGCTGTGTTG            | GGCTGTGTTG            | TCACCGTTGT |
| TCACCGTTGT TCTCAGCTTC | TCTCAGCTTC TGCACCTGTT | 1171       |
| TGCACCTGTT 1171       | CTGCTAATCG            | AGTCCAAGCC |
| CTGCTAATCG AGTCCAAGCC | GAGCCAGTTC            | TTGTTGGGCC |
| GAGCCAGTTC            | GAGTTGGGGAACAGACAGGA  | 1231       |

|                        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|
| TTGTTGGGCC             | GTGTCAAGAA ATTAGATGCT GAATGGGATG  |
| GAGTTGGGGA             | TCAGTGTTCT AAGGAGTTCT TAAGTTCTTA  |
| ACAGACAGGA 1231        | 1291                              |
| GTGTCAAGAA ATTAGATGCT  | AGTGTGATGA ATTGTTATTT CTTTTGTTAC  |
| GAATGGGATG TCAGTGTTCT  | TTTGTTTTCA TTTTCATGAT AGCTATAATC  |
| AAGGAGTTCT TAAGTTCTTA  | 1351                              |
| 1291                   |                                   |
| AGTGTGATGA ATTGTTATTT  |                                   |
| CTTTTGTTAC TTTGTTTTCA  |                                   |
| TTTTCATGAT AGCTATAATC  |                                   |
| 1351                   |                                   |
|                        |                                   |
| TCCCAGTGAG             | TCCCAGTGAG GAGAAATCTC ATGTCACTTA  |
| GAGAAATCTC ATGTCACTTA  | AA TACACAC ATGGAGGTTT AATCAGAAGG  |
| AAATACACAC ATGGAGGTTT  | 1411                              |
| AATCAGAAGG 1411        | CTGAATACCA TTTCAGAAGA GGTTCTGTGA  |
| CTGAATACCA TTTCAGAAGA  | TTCTCTTGCT TTTGATGAAG CATTTTTATC  |
| GGTTCTGTGA TTCTCTTGCT  | 1471                              |
| TTTGATGAAG CATTTTTATC  | ACCTCTCTTT GGATGCAGAT GAGTCTGTAT  |
| 1471                   | GGCACTTGGA GTTTTGTGTT             |
| ACCTCTCTTT GGATGCAGAT  | GCACACCCCT 1531                   |
| GAGTCTGTAT GGCACCTGGA  | ACTGGATAGT GCTAATAACT ATTTGCCAGT  |
| GTTTTGTGTT GCACACCCCT  | AGCTGATTTG TTTATGTGGA TCACGTCTCA  |
| 1531                   | 1591                              |
| ACTGGATAGT GCTAATAACT  |                                   |
| ATTTGCCAGT AGCTGATTTG  |                                   |
| TTTATGTGGA TCACGTCTCA  |                                   |
| 1591                   |                                   |
|                        |                                   |
| CAGAGTTTAT TGGAATGTTT  | CAGAGTTTAT TGGAATGTTT GATCATGTTT  |
| GATCATGTTT TCTCAGAACT  | TCTCAGAACT GTTTTTGCTG TAGTTGAGTT  |
| GTTTTTGCTG TAGTTGAGTT  | 1651                              |
| 1651                   | TGCCCCATATT TATGTAGGCT TTATTTTATT |
| TGCCCCATATT TATGTAGGCT | TTTTGGATGA TCATTAGTGT TAAAGAAATC  |
| TTATTTTATT TTTTGGATGA  | 1711                              |
| TCATTAGTGT TAAAGAAATC  | AACTGAAAAC CATGAATAAT ACTGTAAAAA  |

1711 GACAAAACAG TTAAAAGCAG TATTCCTGAT  
 AACTGAAAAC CATGAATAAT 1771  
 ACTGTAAAAA GACAAAACAG TTCTGTCTCC CCAGTATCTA ATATTGGGGT  
 TTAAAAGCAG TATTCCTGAT GGTATTTCTA AGAATGTTGA CAACATTATC  
 1771 1831  
 TTCTGTCTCC CCAGTATCTA  
 ATATTGGGGT GGTATTTCTA  
 AGAATGTTGA CAACATTATC  
 1831

TGAGGCTTTC TTAAGGATT TGAGGCTTTC TTAAGGATT CCACACATTC  
 CCACACATTC ATATAAAAAA ATATAAAAAA AATGAGTTTA GTATTTGTTT  
 AATGAGTTTA GTATTTGTTT 1891  
 1891 CTCCATGGCT TCTCTATAAC CCAGTACACT  
 CTCCATGGCT TCTCTATAAC GAAGTATCGG TGACTGCATA TGGCAACTCC  
 CCAGTACACT GAAGTATCGG 1951  
 TGACTGCATA TGGCAACTCC ATCAGTGAGC TGTGATGGTA GGATTTTCCT  
 1951 ACCTCTGTAC TTTTACCTGT AGACTATTTT  
 ATCAGTGAGC TGTGATGGTA 2011  
 GGATTTTCCT ACCTCTGTAC TACTACGGTG CTTTATAATG TGTTTTAAAG  
 TTTTACCTGT AGACTATTTT CATTGCATTT ACAAAGAAA AATGCTGTAA  
 2011 2071  
 TACTACGGTG CTTTATAATG  
 TGTTTTAAAG CATTGCATTT  
 ACAAAGAAA AATGCTGTAA  
 2071

ATATTGCATA TTTTATGTAT ATATTGCATA TTTTATGTAT TTGGACCAAA  
 TTGGACCAAA AAGTTACAAG AAGTTACAAG TCAGTAGATA AAAAGTGGTT  
 TCAGTAGATA AAAAGTGGTT 2131  
 2131 TTGCACC 2138  
 TTGCACC  
 2138

【0072】  
 配列番号：2

[0072]  
 Sequence number: 2



配列の長さ : 356

Sequence length: 356

配列の型 : アミノ酸

Sequence type: Amino acid

トポロジー : 直鎖状

Topology: Linear

配列の種類 : タンパク質

Type of sequence: Protein

配列

Sequence

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys

Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu

Leu Gln Leu Leu Ala

Leu Ala

1 5 10 15

1

5

10

15

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu

Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile

Glu Asn Gln Ile Gln

Gln

20 25 30

20

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ala Lys Leu Glu Arg

25

30

Ala Ile Ala Arg His

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ala

35 40 45

Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg

His

35

40

45

Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg

Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp

His Thr Met Asp Gly Pro Arg

Gly Pro Arg Gln

Gln

50 55 60

50

55

Asp Ala Ala Val Asp Glu Glu Glu Asp Ile Val Ile

60

Ile Tyr Asn Arg

Asp Ala Ala Val Asp Glu Glu Glu

65 70 75 80

Asp Ile Val Ile Ile Tyr Asn Arg

65

70

75

80

Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser

Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile

Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu

Ala Tyr Asp Leu

85

85 90 95

|                                 |                                             |                                                 |
|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 90                              | 95                                          | Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu His Ile Asn |
| Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val | Thr Thr Lys Asn                             |                                                 |
| Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn | 100 105 110                                 |                                                 |
| 100                             |                                             |                                                 |
| 105                             | 110                                         |                                                 |
| Asn Pro Val Met Ser Leu Gln     | Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg |                                                 |
| Asp Gln Val Arg Phe Val Lys     | Phe Val Lys Asn Ile                         |                                                 |
| Asn Ile                         | 115 120 125                                 |                                                 |
| 115                             | Thr Thr Trp Asn Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr |                                                 |
| 120                             | 125                                         | His Gly His Ile Ser                             |
| Thr Thr Trp Asn Glu Met Lys     | 130 135 140                                 |                                                 |
| Pro Gly Phe Tyr His Gly His Ile |                                             |                                                 |
| Ser                             |                                             |                                                 |
| 130                             | 135                                         |                                                 |
| 140                             |                                             |                                                 |
| Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe     | Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys |                                                 |
| Gly Val Lys Lys Lys Pro Ile Tyr | Lys Pro Ile Tyr Ile                         |                                                 |
| Ile                             | 145 150 155 160                             |                                                 |
| 145                             | 150                                         | Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser |
| 155                             | 160                                         | Tyr Tyr Tyr Phe                                 |
| Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu | 165 170 175                                 |                                                 |
| Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe |                                             |                                                 |
| 165                             |                                             |                                                 |
| 170                             | 175                                         |                                                 |
| Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr     | Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu |                                                 |
| Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg     | Arg Arg Arg Lys Gln                         |                                                 |
| Lys Gln                         | 180 185 190                                 |                                                 |
| 180                             | Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala |                                                 |
| 185                             | 190                                         | Glu Gly Gly Ser Asp                             |
| Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp     | 195 200 205                                 |                                                 |
| Glu Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser |                                             |                                                 |
| Asp                             |                                             |                                                 |
| 195                             |                                             |                                                 |

200

205

Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro  
 Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Phe Phe Cys Gly His  
 Gly His 210 215 220

210 215 Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala  
 Met Asp Gln Ala

Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val 225 230 235 240  
 Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp  
 Gln Ala

225 230  
 235 240

Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly  
 Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Glu

245 245 250 255  
 250 255 Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala  
 Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Pro Arg Phe Phe  
 Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg 260 265 270  
 Phe Phe

260

265

270

Arg Gly Ala Thr Asp Leu Tyr Arg Arg Gly Ala Thr Asp Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Lys  
 Thr Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Ser His Leu Arg

275 275 280 285  
 280 285 Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln  
 Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Thr Ile Ala Lys Leu  
 Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys 290 295 300  
 Leu

290 295  
 300

Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu  
 Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Phe Tyr Glu Phe Ala  
 Ala 305 310 315 320

305 310 Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val  
 315 320 Arg Glu Lys Asp  
 Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile 325 330 335  
 Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys  
 Asp

325  
 330 335

Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe  
 Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Tyr Glu Lys Ile Tyr  
 340 340 345 350  
 345 350 Pro Lys Ser Asn  
 Pro Lys Ser Asn 355  
 355

## 【0073】

配列番号 : 3  
 配列の長さ : 2172  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : cDNA  
 起原  
 生物名 : ヒト

組織の種類 : 胎児脳  
 配列の特徴  
 特徴を表す記号 : CDS  
 存在位置 : 355..1422

特徴を決定した方法 : P  
 配列の特徴  
 特徴を示す記号 :  
 transmembrane domain  
 存在位置 : 394..435

## [0073]

Sequence number: 3  
 Sequence length: 2172  
 Sequence type: Nucleic acid  
 The number of strands: Car form

Topology: Linear  
 Type of sequence: cDNA  
 Origin  
 Organism name: Human

The kind of tissue: Fetus brain  
 Sequence characteristics  
 The symbol showing the characteristics: CDS  
 Location: 355.1422

Method: P which determined the characteristics  
 Sequence characteristics  
 The symbol which shows the characteristics:  
 transmembrane domain  
 Location: 394.435



特徴を決定した方法 : P

配列の特徴

特徴を示す記号 : potential

N-glycosylation site

存在位置 : 676..684

Method:P which determined the characteristics

Sequence characteristics

The symbol which shows the characteristics:

potential N-glycosylation site

Location: 676.684

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴

特徴を示す記号 : potential

N-glycosylation site

存在位置 : 733..741

Method:S which determined the characteristics

Sequence characteristics

The symbol which shows the characteristics:

potential N-glycosylation site

Location: 733.741

特徴を決定した方法 : S

配列

GGGAAGGAAG

GAAGAGAGGG

AGGCGGGCAA

GCAGGCGGGC

GCGGGGGTCTG

GAGACTGAGG 60

CAGTAGAGGG

AGGCGAGAGC

CCGGCAGCCG

CTTCGCGCTG

TTTGCTGGCG

CGGGTTTTGG 120

Method:S which determined the characteristics

Sequence

GGGAAGGAAG

GAAGAGAGGG

AGGCGGGCAA

GCAGGCGGGC

GCGGGGGTCTG GAGACTGAGG 60

CAGTAGAGGG

AGGCGAGAGC

CCGGCAGCCG

CTTCGCGCTG

TTTGCTGGCG CGGGTTTTGG 120

AGGGGGCGGC

CGTTTAGTCG

GCTGAGGAGA

AGCGGACACC

AGCGGCGTTG

GTGATAGCGC 180

CTGGGGGAGG

GGGACTGGAG

AGGGGGCGGC

GCTGAGGAGA

AGCGGCGTTG GTGATAGCGC 180

CTGGGGGAGG

GGGACTGGAG

AGGCGAGAAG

GGGGGTTCGC

TGCGGTGGTT CTCTCGCTGT 240

CGCTCTCTCT

TTGCCTCGCT

CCCGGCTCGG

CGGGCTCCTC

AGGCGAGAAG  
 GGGGGTTTCG  
 TCGGGTGGTT  
 CTCTCGCTGT 240  
 CGCTCTCTCT TTGCCTCGCT  
 CCCGGCTCGG  
 CGGGCTCCTC  
 CCGGCGTCTC  
 TCTCGCCTCC 300  
 GGGGTCCCGC  
 TCCCGCCCC  
 CCGCGGTATG TCTTGATCCC  
 GAGCAGCGGG TTTC ATG  
 357

Met  
 Met 1  
 GGG CTC CTC AGG ATT ATG ATG CCG CCC  
 1 AAG TTG CAG CTG CTG GCG GTG 405  
 GGG CTC CTC AGG ATT ATG Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys Leu  
 ATG CCG CCC AAG TTG CAG Gln Leu Leu Ala Val  
 CTG CTG GCG GTG  
 405  
 Gly Leu Leu Arg Ile Met Met  
 Pro Pro Lys Leu Gln Leu Leu  
 Ala Val

5 10 15  
 10 15 GTG GCC TTC GCG GTG GCG ATG CTC TTC  
 GTG GCC TTC GCG GTG TTG GAAAC CAG ATC CAG AAA 453  
 GCG ATG CTC TTC TTG GAA Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu Glu  
 AAC CAG ATC CAG AAA Asn Gln Ile Gln Lys  
 453 20 25 30  
 Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu  
 Phe Leu Glu Asn Gln Ile Gln  
 Lys

20

25

30

CTG GAG GAG TCC CGC CTG GAG GAG TCC CGC TCG AAG CTA GAA  
 TCG AAG CTA GAA AGG GCT AGG GCT ATT GCA AGA CAC GAA 501  
 ATT GCA AGA CAC GAA Leu Glu Glu Ser Arg Ser Lys Leu Glu Arg Ala Ile  
 501 Ala Arg His Glu  
 Leu Glu Glu Ser Arg Ser Lys 35 40 45  
 Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg His GTC CGA GAA ATT GAG CAG CGA CAT ACA  
 Glu ATG GAT GGC CCT CGG CAA GAT 549

35

40

45

GTC CGA GAA ATT GAG CAG  
 CGA CAT ACA ATG GAT GGC  
 CCT CGG CAA GAT 549

Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp Gly  
 Thr Met Asp Gly Pro Arg Gln Pro Arg Gln Asp  
 Asp 50 55 60 65  
 50 55 GCC ACT TTA GAT GAG GAA GAG GAC ATG  
 60 65 GTG ATC ATT TAT AAC AGA GTT 597  
 GCC ACT TTA GAT GAG GAA Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Asp Met Val Ile Ile  
 GAG GAC ATG GTG ATC ATT Tyr Asn Arg Val  
 TAT AAC AGA GTT 597  
 Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu  
 Asp Met Val Ile Ile Tyr Asn Arg  
 Val

70

70 75 80

75

80

CCC AAA ACG GCA AGC ACT TCA TTT ACC  
 CCC AAA ACG GCA AGC ACT AAT ATC GCC TAT GAC CTG TGT 645  
 TCA TTT ACC AAT ATC GCC Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile Ala  
 TAT GAC CTG TGT 645 Tyr Asp Leu Cys  
 Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser 85 90 95  
 Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu  
 Cys

85

90

95

GCA AAG AAT AAA TAC CAT GCA AAG AAT AAA TAC CAT GTC CTT CAT  
 GTC CTT CAT ATC AAC ACT ATC AAC ACT ACC AAA AAT AAT 693  
 ACC AAA AAT AAT 693 Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Leu His Ile Asn Thr  
 Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Leu Thr Lys Asn Asn  
 His Ile Asn Thr Thr Lys Asn Asn 100 105 110  
 100 CCA GTG ATG TCA TTG CAA GAT CAG GTG  
 105 110 CGC TTT GTAAAG AAT ATA ACT 741  
 CCA GTG ATG TCA TTG CAA  
 GAT CAG GTG CGC TTT GTA  
 AAG AAT ATA ACT 741

Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg Phe  
 Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile Val Lys Asn Ile Thr  
 Thr 115 120 125  
 115 120 TCC TGG AAA GAG ATG AAA CCA GGA TTT  
 125 TAT CAT GGA CAC GTT TCT TAC 789  
 TCC TGG AAA GAG ATG AAA Ser Trp Lys Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr His  
 CCA GGA TTT TAT CAT GGA Gly His Val Ser Tyr  
 CAC GTT TCT TAC 789  
 Ser Trp Lys Glu Met Lys Pro  
 Gly Phe Tyr His Gly His Val Ser  
 Tyr

130 135 130 135 140 145  
 140 145 TTG GAT TTT GCA AAA TTT GGT GTG AAG  
 TTG GAT TTT GCA AAA TTT AAG AAA CCA ATT TAC ATT AAT 837  
 GGT GTG AAG AAG AAA CCA Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys Lys  
 ATT TAC ATT AAT 837 Pro Ile Tyr Ile Asn  
 Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly 150 155 160  
 Val Lys Lys Lys Pro Ile Tyr Ile  
 Asn

150

155

160

GTC ATA AGG GAT CCT ATT GTC ATA AGG GAT CCT ATT GAG AGG CTA  
 GAG AGG CTA GTT TCT TAT GTT TCT TAT TAT TAC TTT CTG 885  
 TAT TAC TTT CTG 885 Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser Tyr  
 Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Tyr Tyr Phe Leu  
 Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu 165 170 175  
 165 AGA TTT GGA GAT GAT TAT AGA CCA GGG  
 170 175 TTA CGG AGA CGA AAA CAA GGA 933  
 AGA TTT GGA GAT GAT TAT  
 AGA CCA GGG TTA CGG AGA  
 CGA AAA CAA GGA 933

Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu Arg  
 Pro Gly Leu Arg Arg Arg Lys Arg Arg Lys Gln Gly  
 Gln Gly 180 185 190  
 180 GAC AAA AAG ACC TTT GAT GAA TGT GTA  
 185 190 GCA GAA GGT GGC TCA GAC TGT 981  
 GAC AAA AAG ACC TTT GAT Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala Glu  
 GAA TGT GTA GCA GAA GGT Gly Gly Ser Asp Cys  
 GGC TCA GAC TGT 981  
 Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu  
 Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser  
 Asp Cys

195 200 195 200 205  
 205 GCT CCA GAG AAG CTC TGG CTT CAA ATC  
 GCT CCA GAG AAG CTC TGG CCG TTC TTC TGT GGC CAT AGC 1029  
 CTT CAA ATC CCG TTC TTC Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro Phe  
 TGT GGC CAT AGC 1029 Phe Cys Gly His Ser  
 Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu 210 215 220 225  
 Gln Ile Pro Phe Phe Cys Gly  
 His Ser  
 210 215  
 220 225

TCC GAA TGC TGG AAT GTG TCC GAA TGC TGG AAT GTG GGA AGC AGG

|                                     |                                                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| GGA AGC AGG TGG GCT ATG             | TGG GCT ATG GAT CAA GCC AAG 1077                |
| GAT CAA GCC AAG 1077                | Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala     |
| Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly         | Met Asp Gln Ala Lys                             |
| Ser Arg Trp Ala Met Asp Gln Ala     | 230 235 240                                     |
| Lys                                 | TAT AAC CTA ATT AAT GAA TAT TTT CTG             |
| 230                                 | GTG GGA GTT ACT GAA GAA CTT 1125                |
| 235                                 | 240                                             |
| TAT AAC CTA ATT AAT GAA             |                                                 |
| TAT TTT CTG GTG GGA GTT             |                                                 |
| ACT GAA GAA CTT 1125                |                                                 |
| Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe     | Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly Val |
| Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Leu     | Thr Glu Glu Leu                                 |
| 245                                 | 245 250 255                                     |
| 250                                 | 255                                             |
| GAA GAT TTT ATC ATG TTA TTG GAG GCA | GCA TTG CCC CGG TTT TTC AGG 1173                |
| GAA GAT TTT ATC ATG TTA             | Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala Leu     |
| TTG GAG GCA GCA TTG CCC             | Pro Arg Phe Phe Arg                             |
| CGG TTT TTC AGG 1173                |                                                 |
| Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu         |                                                 |
| Glu Ala Ala Leu Pro Arg Phe         |                                                 |
| Phe Arg                             |                                                 |
| 260                                 | 260 265 270                                     |
| 265                                 | 270                                             |
| GGT GCT ACT GAA CTC TAT             | GGT GCT ACT GAA CTC TAT CGC ACA GGA             |
| CGC ACA GGA AAG AAA TCT             | AAG AAA TCT CAT CTT AGG AAA 1221                |
| CAT CTT AGG AAA 1221                | Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Lys Ser |
| Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Thr     | His Leu Arg Lys                                 |
| Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Lys     | 275 280 285                                     |
| 275                                 | 280                                             |
| 285                                 |                                                 |
| ACC ACA GAG AAG AAA CTC             | ACC ACA GAG AAG AAA CTC CCC ACT AAA             |
| CCC ACT AAA CAA ACC ATT             | CAA ACC ATT GCA AAA CTA CAG 1269                |
| GCA AAA CTA CAG 1269                | Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln Thr Ile |
| Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro         | Ala Lys Leu Gln                                 |

Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys Leu 290 295 300 305  
 Gln CAA TCT GAT ATT TGG AAA ATG GAG AAT  
 290 295 GAG TTC TAT GAA TTT GCA CTA 1317  
 300 305  
 CAA TCT GAT ATT TGG AAA  
 ATG GAG AAT GAG TTC TAT  
 GAA TTT GCA CTA 1317

Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu Phe  
 Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Ala Tyr Glu Phe Ala Leu  
 Leu 310 315 320  
 310 315 320 GAG CAG TTC CAA TTC ATC AGA GCC CAT  
 GCC GTT CGA GAA AAA GAT GGA 1365  
 GAG CAG TTC CAA TTC ATC Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val Arg  
 AGA GCC CAT GCC GTT CGA Glu Lys Asp Gly  
 GAAAAA GAT GGA 1365  
 Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala  
 His Ala Val Arg Glu Lys Asp Gly

325 325 330 335  
 330 335 GAC CTC TAC ATC CTC GCA CAA AAC TTT  
 GAC CTC TAC ATC CTC GCA TTC TAT GAA AAG ATT TAC CCT 1413  
 CAA AAC TTT TTC TAT GAA Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe Tyr  
 AAG ATT TAC CCT 1413 Glu Lys Ile Tyr Pro  
 Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn 340 345 350  
 Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Pro  
 340  
 345 350

AAG TCG AAC TGAGTATAAG AAG TCG AAC TGAGTATAAG GTGTGACTAT  
 GTGTGACTAT TAGATTCTTG TAGATTCTTG AACTAAAATT 1462  
 AACTAAAATT Lys Ser Asn  
 1462 355  
 Lys Ser Asn TGACCCTGTC TTCACCTTTG TTCTCAGCTC  
 355 CACAGTCTGG ATTGCTGACA GTAGGTGTAT  
 TGACCCTGTC TTCACCTTTG 1522

TTCTCAGCTC  
CACAGTCTGG ATTGCTGACA  
GTAGGTGTAT 1522

|                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| ATGACAATTT GTATTGAGCC | ATGACAATTT GTATTGAGCC AAATTAGGAA |
| AAATTAGGAA ACAGACAGTA | ACAGACAGTA ACGTCAAGGA AGTAGATACT |
| ACGTCAAGGA AGTAGATACT | 1582                             |
| 1582                  | GGCTGGCATT GTCAGTGTTT TAAGTTTCAG |
| GGCTGGCATT            | GCATTTTAT TTTTCCTGG CTAAACGTTG   |
| GTCAGTGTTT TAAGTTTCAG | 1642                             |
| GCATTTTAT TTTTCCTGG   | GTGAAAGTTA TAACCTCCTG CCTGGGAGAA |
| CTAAACGTTG 1642       | AATATACATC ACCTAAAATG AACTTATGGC |
| GTGAAAGTTA TAACCTCCTG | 1702                             |
| CCTGGGAGAA AATATACATC | AGGTCTAATC AAAAGGCTAA ATACAATTTT |
| ACCTAAAATG AACTTATGGC | AGAAAAGGTT CTGATACTCT TGTTTTTGAT |
| 1702                  | 1762                             |
| AGGTCTAATC AAAAGGCTAA |                                  |
| ATACAATTTT AGAAAAGGTT |                                  |
| CTGATACTCT TGTTTTTGAT |                                  |
| 1762                  |                                  |

|                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| AAAGCATTTT TTCAACTAAC | AAAGCATTTT TTCAACTAAC CATGAATTAA |
| CATGAATTAA GATGAGTCCA | GATGAGTCCA TTTGCCTCTT CTGCCTTCAC |
| TTTGCCTCTT CTGCCTTCAC | 1822                             |
| 1822                  | TGAGGGTTTG GGTATACAC CTCTACTGAA  |
| TGAGGGTTTG GGTATACAC  | TTGTGTTAAT AACTGTTTGG CAGTGTGTAC |
| CTCTACTGAA TTGTGTTAAT | 1882                             |
| AACTGTTTGG CAGTGTGTAC | TTTGTTTTTG TGAGTCATGT CTCATGAAAT |
| 1882                  | TTATTGGAAT GTTTAATCAT ATTTGCTAAG |
| TTTGTTTTTG TGAGTCATGT | 1942                             |
| CTCATGAAAT TTATTGGAAT | AAATGTTTCT GCTGTAGTTG GATTTGCCCA |
| GTTTAATCAT ATTTGCTAAG | TATTTATGTA GGTGGTTTAA ATTTTTTAAA |
| 1942                  | 2002                             |
| AAATGTTTCT GCTGTAGTTG |                                  |
| GATTTGCCCA TATTTATGTA |                                  |
| GGTGGTTTAA ATTTTTTAAA |                                  |



2002

TGGTGATTAG TGTAAAAAT TGGTGATTAG TGTAAAAAT CAATTTAAAT  
 CAATTTAAAT CATGACTAAT CATGACTAAT ATGGTAAAAA GATAAAGCAT  
 ATGGTAAAAA GATAAAGCAT 2062  
 2062 CAAAGCAGTA TTTCTCATTC CTGCCTCCTC  
 CAAAGCAGTA TTTCTCATTC AATATCTAAT ACTGGGAAGA TACTTCAAAG  
 CTGCCTCCTC AATATCTAAT 2122  
 ACTGGGAAGA TACTTCAAAG AATATTGAGA TTGTCTGAAG TTTTAGTTAA  
 2122 GATTTTCACA CATTAATATC 2172  
 AATATTGAGA TTGTCTGAAG  
 TTTTAGTTAA GATTTTCACA  
 CATTAATATC  
 2172

【0074】

配列番号 : 4

配列の長さ : 356

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

[0074]

Sequence number: 4

Sequence length: 356

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met  
 Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu  
 Leu Ala

1

5

10

15

Type of sequence: Protein

Sequence

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys  
 Leu Gln Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met  
 Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile  
 Gln

20

25

30

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser  
 Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu  
 Glu Asn Gln Ile Gln  
 20 25 30

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Lys Leu Glu Arg  
 Ala Ile Ala Arg His

35 40 45

His

35

40

45

Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp

His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gln

Gln 50 55 60

50

55 Asp Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Asp Met Val

60

Ile Ile Tyr Asn Arg

Asp Ala Thr Leu Asp Glu Glu 65 70 75 80

Glu Asp Met Val Ile Ile Tyr Asn

Arg

65

70

75

80

Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile

Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu Ala Tyr Asp Leu

85

85 90 95

90

95

Cys Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Leu His Ile Asn

Cys Ala Lys Asn Lys Tyr His Val Thr Thr Lys Asn

Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn 100 105 110

100

105

110

Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg

Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Phe Val Lys Asn Ile

Asn Ile 115 120 125

115

Thr Ser Trp Lys Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr

120

125

His Gly His Val Ser

Thr Ser Trp Lys Glu Met Lys 130 135 140

Pro Gly Phe Tyr His Gly His Val

Ser

130

135

140

Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys

|                                 |                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Gly Val Lys Lys Lys Pro Ile Tyr | Lys Pro Ile Tyr Ile                                 |
| Ile                             | 145 150 155 160                                     |
| 145                             | 150 Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser |
| 155                             | 160 Tyr Tyr Tyr Phe                                 |
| Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu | 165 170 175                                         |
| Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe |                                                     |
|                                 | 165                                                 |
| 170                             | 175                                                 |

|                                 |                                                 |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr     | Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu     |
| Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg     | Arg Arg Arg Lys Gln                             |
| Lys Gln                         | 180 185 190                                     |
|                                 | 180 Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala |
| 185                             | 190 Glu Gly Gly Ser Asp                         |
| Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp     | 195 200 205                                     |
| Glu Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser |                                                 |
| Asp                             |                                                 |
|                                 | 195                                             |
| 200                             | 205                                             |

|                             |                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp | Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro         |
| Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys | Phe Phe Cys Gly His                                 |
| Gly His                     | 210 215 220                                         |
| 210                         | 215 Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val Gly Ser Arg Trp Ala |
| 220                         | Met Asp Gln Ala                                     |
| Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val | 225 230 235 240                                     |
| Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp |                                                     |
| Gln Ala                     |                                                     |
| 225                         | 230                                                 |
| 235                         | 240                                                 |

|                                 |                                                 |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr | Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly |
| Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu | Val Thr Glu Glu                                 |
|                                 | 245 250 255                                     |
| 250                             | 255 Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala |
| Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu     | Leu Pro Arg Phe Phe                             |

Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg 260 265 270

Phe Phe

260

265

270

Arg Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Arg Gly Ala Thr Glu Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Lys

Thr Gly Lys Lys Ser His Leu Arg Ser His Leu Arg

275

275 280 285

280

285

Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Pro Thr Lys Gln

Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu Thr Ile Ala Lys Leu

Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys 290 295 300

Leu

290

295

300

Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu

Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe Phe Tyr Glu Phe Ala

Ala

305 310 315 320

305

310

Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val

315

320

Arg Glu Lys Asp

Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile 325 330 335

Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys

Asp

325

330

335

Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe

Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr Tyr Glu Lys Ile Tyr

340

340 345 350

345

350

Pro Lys Ser Asn

Pro Lys Ser Asn

355

355

【 0 0 7 5 】

配列番号 : 5

配列の長さ : 13

[0075]

Sequence number: 5

Sequence length: 13

配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 一本鎖

Sequence type: Amino acid  
Topology: Single strand

配列の種類 : ペプチド  
配列

Type of sequence: Peptide  
Sequence

Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg  
Tyr His Val Leu His Ile

Asp Leu Cys Ala Lys Asn Arg Tyr His Val Leu  
His Ile

1  
10

5 1 5 10

【0076】

[0076]

配列番号 : 6

Sequence number: 6

配列の長さ : 9

Sequence length: 9

配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 一本鎖

Sequence type: Amino acid  
Topology: Single strand

配列の種類 : ペプチド  
配列

Type of sequence: Peptide  
Sequence

Asp Gln Val Arg Phe Val Lys  
Asn Ile

Asp Gln Val Arg Phe Val Lys Asn Ile

1

5

1 5

【0077】

[0077]

配列番号 : 7

Sequence number: 7

配列の長さ : 9

Sequence length: 9

配列の型 : アミノ酸  
トポロジー : 一本鎖

Sequence type: Amino acid  
Topology: Single strand

配列の種類 : ペプチド  
配列

Type of sequence: Peptide  
Sequence

Asp Xaa Tyr Arg Pro Gly Leu  
Xaa Arg

Asp Xaa Tyr Arg Pro Gly Leu Xaa Arg

1

5

1 5

【0078】

[0078]

配列番号 : 8

Sequence number: 8

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 一本鎖

Sequence length: 8

Sequence type: Amino acid

Topology: Single strand

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Ile Val Ile Xaa Tyr Asn Arg

1

5

Type of sequence: Peptide

Sequence

Asp Ile Val Ile Xaa Tyr Asn Arg

1 5

【 0 0 7 9 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 一本鎖

[0079]

Sequence number: 9

Sequence length: 4

Sequence type: Amino acid

Topology: Single strand

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Leu Tyr Arg

1

Type of sequence: Peptide

Sequence

Asp Leu Tyr Arg

1

【 0 0 8 0 】

配列番号 : 10

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

[0080]

Sequence number: 10

Sequence length: 20

Sequence type: Nucleic acid

Topology: Linear

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成D

NA

配列

GCNAARAAYM GNTAYCAYGT

20

The number of strands: Single strand

Type of sequence: Other nucleic acid

Synthetic DNA

Sequence

GCNAARAAYM GNTAYCAYGT 20

【 0 0 8 1 】

配列番号 : 11

配列の長さ : 20

[0081]

Sequence number: 11

Sequence length: 20

配列の型：核酸

Sequence type: Nucleic acid

トポロジー：直鎖状

Topology: Linear

鎖の数：一本鎖

The number of strands: Single strand

配列の種類：他の核酸 合成D

Type of sequence: Other nucleic acid

NA

Synthetic DNA

配列

Sequence

MGNTAYCAYG TNYTNCAYAT MGNTAYCAYG TNYTNCAYAT 20

20

【0082】

[0082]

配列番号：12

Sequence number: 12

配列の長さ：20

Sequence length: 20

配列の型：核酸

Sequence type: Nucleic acid

トポロジー：直鎖状

Topology: Linear

鎖の数：一本鎖

The number of strands: Single strand

配列の種類：他の核酸 合成D

Type of sequence: Other nucleic acid

NA

Synthetic DNA

配列

Sequence

TTYTTNACRA ANCKNACYTG TTYTTNACRAANCKNACYTG 20

20

【0083】

[0083]

配列番号：13

Sequence number: 13

配列の長さ：20

Sequence length: 20

配列の型：核酸

Sequence type: Nucleic acid

トポロジー：直鎖状

Topology: Linear

鎖の数：一本鎖

The number of strands: Single strand

配列の種類：他の核酸 合成D

Type of sequence: Other nucleic acid

NA

Synthetic DNA

配列

Sequence

TTNACRAANC KNACYTGRTC TTNACRAANC KNACYTGRTC 20

20

【0084】

配列番号 : 14

配列の長さ : 356

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

[0084]

Sequence number: 14

Sequence length: 356

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

配列の種類 : タンパク質

Type of sequence: Protein

配列

Sequence

Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Gly Leu Leu Arg Ile Met Met Pro Pro Lys

Met Pro Pro Lys Leu Gln Leu Leu Gln Leu Leu Ala

Leu Ala 1 5 10 15

1 5

10 15

Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Val Val Ala Phe Ala Val Ala Met Leu Phe Leu

Leu Phe Leu Glu Asn Gln Ile Glu Asn Gln Ile Gln

Gln 20 25 30

20 Lys Leu Glu Glu Ser Arg Xaa Lys Leu Glu Arg

25 30 Ala Ile Ala Arg His

Lys Leu Glu Glu Ser Arg Xaa 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Ala Ile Ala Arg

His

35

40 45

Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg Glu Val Arg Glu Ile Glu Gln Arg His Thr Met Asp

His Thr Met Asp Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gln

Gln 50 55 60

50 55 Asp Ala Xaa Xaa Asp Glu Glu Glu Asp Xaa Val

60 Ile Ile Tyr Asn Arg

Asp Ala Xaa Xaa Asp Glu Glu 65 70 75 80

Glu Asp Xaa Val Ile Ile Tyr Asn

Arg

65 70

75 80



|                                 |                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser | Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ser Phe Thr Asn Ile     |
| Phe Thr Asn Ile Ala Tyr Asp Leu | Ala Tyr Asp Leu                                     |
| 85                              | 85 90 95                                            |
| 90                              | 95 Cys Ala Lys Xaa Arg Tyr His Val Leu His Ile Asn  |
| Cys Ala Lys Xaa Arg Tyr His Val | Thr Thr Lys Asn                                     |
| Leu His Ile Asn Thr Thr Lys Asn | 100 105 110                                         |
| 100                             |                                                     |
| 105                             | 110                                                 |
| Asn Pro Val Met Ser Leu Gln     | Asn Pro Val Met Ser Leu Gln Asp Gln Val Arg         |
| Asp Gln Val Arg Phe Val Lys     | Phe Val Lys Asn Ile                                 |
| Asn Ile                         | 115 120 125                                         |
| 115                             | Thr Xaa Trp Xaa Glu Met Lys Pro Gly Phe Tyr         |
| 120                             | 125 His Gly His Xaa Ser                             |
| Thr Xaa Trp Xaa Glu Met Lys     | 130 135 140                                         |
| Pro Gly Phe Tyr His Gly His     |                                                     |
| Xaa Ser                         |                                                     |
| 130                             | 135                                                 |
| 140                             |                                                     |
| Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe     | Tyr Leu Asp Phe Ala Lys Phe Gly Val Lys Lys         |
| Gly Val Lys Lys Lys Pro Ile Tyr | Lys Pro Ile Tyr Ile                                 |
| Ile                             | 145 150 155 160                                     |
| 145                             | 150 Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu Arg Leu Val Ser |
| 155                             | 160 Tyr Tyr Tyr Phe                                 |
| Asn Val Ile Arg Asp Pro Ile Glu | 165 170 175                                         |
| Arg Leu Val Ser Tyr Tyr Tyr Phe |                                                     |
| 165                             |                                                     |
| 170                             | 175                                                 |
| Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr     | Leu Arg Phe Gly Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Leu         |
| Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg     | Arg Arg Arg Lys Gln                                 |
| Lys Gln                         | 180 185 190                                         |
| 180                             | Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp Glu Cys Val Ala         |
| 185                             | 190 Glu Gly Gly Ser Asp                             |
| Gly Asp Lys Lys Thr Phe Asp     | 195 200 205                                         |

Glu Cys Val Ala Glu Gly Gly Ser  
Asp

195

200

205

Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Cys Ala Pro Glu Lys Leu Trp Leu Gln Ile Pro  
Leu Gln Ile Pro Phe Phe Cys Phe Phe Cys Gly His  
Gly His 210 215 220

210

215

220

Ser Ser Glu Cys Trp Asn Val 225 230 235 240

Gly Ser Arg Trp Ala Met Asp

Gln Ala

225

230

235

240

Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr Asn Leu Ile Asn Glu Tyr Phe Leu Val Gly  
Phe Leu Val Gly Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Glu

245

245 250 255

250

255

Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Glu Ala Ala  
Leu Glu Asp Phe Ile Met Leu Leu Pro Arg Phe Phe

Leu Glu Ala Ala Leu Pro Arg 260 265 270

Phe Phe

260

265

270

Arg Gly Ala Thr Xaa Leu Tyr Arg Gly Ala Thr Xaa Leu Tyr Arg Thr Gly Lys Lys  
Arg Thr Gly Lys Lys Ser His Leu Ser His Leu Arg

Arg

275 280 285

275

280

285

Lys Thr Thr Glu Lys Lys Leu 290 295 300

Pro Thr Lys Gln Thr Ile Ala Lys

Leu

290

295

300

|                                 |                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met | Gln Gln Ser Asp Ile Trp Lys Met Glu Asn Glu         |
| Glu Asn Glu Phe Tyr Glu Phe     | Phe Tyr Glu Phe Ala                                 |
| Ala                             | 305 310 315 320                                     |
| 305                             | 310 Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile Arg Ala His Ala Val |
| 315                             | 320 Arg Glu Lys Asp                                 |
| Leu Glu Gln Phe Gln Phe Ile     | 325 330 335                                         |
| Arg Ala His Ala Val Arg Glu Lys |                                                     |
| Asp                             |                                                     |
|                                 | 325                                                 |
| 330                             | 335                                                 |
| Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln | Gly Asp Leu Tyr Ile Leu Ala Gln Asn Phe Phe         |
| Asn Phe Phe Tyr Glu Lys Ile Tyr | Tyr Glu Lys Ile Tyr                                 |
|                                 | 340 345 350                                         |
| 345                             | 350 Pro Lys Ser Asn                                 |
| Pro Lys Ser Asn                 | 355                                                 |
| 355                             |                                                     |

## 【図面の簡単な説明】

## [BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

## 【図 1】

HS 2 ST 部分アミノ酸配列と PCR 用プライマーの塩基配列を示す図。

## [FIG. 1]

The figure showing HS2 ST-segment amino acid sequence and the base sequence of the primer for PCR.

## 【図 2】

cDNA 配列から予想されるチャイニーズハムスターの HS 2 ST のアミノ酸配列のハイドロパシープロット。

## [FIG. 2]

The hydropathy plot of the amino acid sequence of HS2ST of the Chinese hamster expected from a cDNA sequence.

## 【図 3】

チャイニーズハムスター由来の HS 2 ST の cDNA とヒト

## [FIG. 3]

The comparison of cDNA of HS2ST derived from a Chinese hamster, and cDNA of HS2ST

由来のHS 2STのcDNAの derived from a human.  
比較。

【図 1】

【FIG. 1】

|              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ペプチド 1       | Asp | Leu | Cys | Ala | Lys | Asn | Arg | Tyr | His | Val | Leu | His | Ile |    |
| プライマー-1s 5'  |     |     |     |     | GCI | AAA | AAT | CGI | TAT | CAT | GT  |     | 3'  |    |
|              |     |     |     |     |     | G   | C   | A   |     | C   | C   |     |     |    |
| プライマー-1st 5' |     |     |     |     |     |     |     | CGI | TAT | CAT | GTC | TTI | CAT | AT |
|              |     |     |     |     |     |     |     | A   |     | C   | C   | C   | C   |    |

|              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ペプチド 2       | Asp | Gln | Val | Arg | Phe | Val | Lys | Asn | Ile |
| プライマー-2a 3'  |     | GTT | CAI | TCT | AAA | CAI | TTT | TT  | 5'  |
|              |     |     | C   | G   |     | G   |     | C   |     |
| プライマー-2ai 3' | CIA | GTT | CAI | TCT | AAA | CAI | TT  |     | 5'  |
|              |     | G   | C   |     | G   |     | G   |     |     |

Peptide 1

Primer 1s 5'

Primer 1si 5'

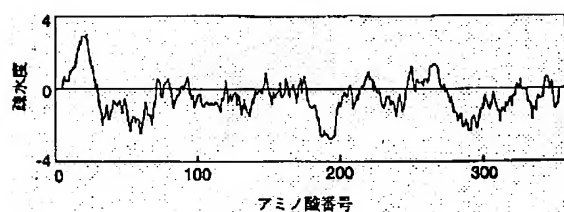
Peptide 2

Primer 2a 3'

Primer 2ai 3'

【図 2】

【FIG. 2】



hydrophobic degree

Amino acid number

【図 3】

【FIG. 3】



上段 (') = ヒト由来の HS2ST のアミノ酸配列

下段 (") = チャイニーズハムスター由来の HS2ST のアミノ酸配列

```

1' MGLLRIMPPKLQLLAVVAFAVANLFLENQIQKLEESRSKLERAIARHEVREIEQRHTWD
*****
1" MGLLRIMPPKLQLLAVVAFAVANLFLENQIQKLEESRAKLERAIARHEVREIEQRHTWD

61' GPRQDATLDEEEDNVIIYNRVPKTASTSFTNIAVDLCAKNKYHVLHINTTKNPNVMSLQD
*****
61" GPRQDAADVDEEDIVIIYNRVPKTASTSFTNIAVDLCAKNRYHVLHINTTKNPNVMSLQD

121' QVRFVKNITSWKENKPGFYHGHVSYLDFAKFGVKKKPIYINVIRDPIERLVSYYYFLRFG
*****
121" QVRFVKNITTWNEKPGFYHGHISYLDFAKFGVKKKPIYINVIRDPIERLVSYYYFLRFG

181' DDYRPGLRRLRRKQGDKKTFDECVAEGGSDCAPEKLWLQIPFFCGHSSECWNVGSRWANDQA
*****
181" DDYRPGLRRLRRKQGDKKTFDECVAEGGSDCAPEKLWLQIPFFCGHSSECWNVGSRWANDQA

241' KYNLINERYFLVGYTEEEEDFIMLLEAALPRFFRGATELYRTGKKSHLRKTTEKKLPTKQT
*****
241" KYNLINERYFLVGYTEEEEDFIMLLEAALPRFFRGATDLYRTGKKSHLRKTTEKKLPTKQT

301' IAKLQQSDIWKMENEFYEFALQFQFIRAHAVREKGDGLYILAQNFFYEKIYPKSN
*****
301" IAKLQQSDIWKMENEFYEFALQFQFIRAHAVREKGDGLYILAQNFFYEKIYPKSN

```

Upper stage (') = The amino acid sequence of HS2ST derived from a human

Lower-stage (") = The amino acid sequence of HS2ST derived from a Chinese hamster



## **THOMSON DERWENT TERMS AND CONDITIONS**

*Thomson Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website:

["THOMSONDERWENT.COM"](http://THOMSONDERWENT.COM) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

**FOR DISCUSSION PURPOSES ONLY -- PLEASE DO NOT ENTER IN THE FILE**

**Proposed claims for U.S. 09/661,992 (Assumes entry of amendment filed 7/2/04)**

1. (currently amended) An antibody or antibody ~~derivative against~~ fragment thereof that binds Factor IX/IXa ~~factor IX/factor IXa which~~ and increases the procoagulant activity of ~~FIXa~~ Factor IXa.

2. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 1, ~~wherein said antibody or antibody derivative~~ that increases the procoagulant activity of ~~FIXa~~ Factor IXa in the presence of ~~FVIII~~ Factor VIII inhibitors.

3. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 1 wherein said the antibody is ~~selected from the group consisting of an~~ IgG, IgM, IgA and or IgE ~~antibodies~~ antibody.

4. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 1, wherein said antibody or antibody ~~derivative~~ fragment is selected from the group consisting of ~~monoclonal antibodies, antibody fragments, chimeric antibodies, humanized antibodies, single chain antibodies, bispecific antibodies, diabodies, and di-, oligo- or multimers thereof~~ a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a single chain antibody, a bispecific antibody, a diabody, and di-, oligo- or multimers thereof.

5-6. (cancelled)

7. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 1, wherein a CDR3 peptide of the antibody or antibody ~~derivative~~ fragment comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

~~Cys-X-X-Tyr-Gly-Asn-Ser-Pro-Lys-Gly-Phe-Ala-Tyr-X-X-Cys, (SEQ ID NO:105)~~ wherein X may be any desired amino acid;

Tyr-Gly-Asn-Ser-Pro-Lys-Gly-Phe-Ala-Tyr (SEQ ID NO:5); and

Asp-Gly-Gly-His-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Phe-Asp-Tyr (SEQ ID NO:6).

8. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 1, wherein the variable region of said antibody or antibody derivative fragment comprises amino acids 1-119 and/or amino acids 135-242 as listed in SEQ ID NO:82.

9. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 8, ~~wherein said antibody or antibody derivative~~ that additionally comprises an artificial linker sequence.

10. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 1, wherein the variable region of said antibody or antibody derivative fragment comprises amino acids 1-121 and/or amino acids 137-249 as listed in SEQ ID NO:84.

11. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 10, ~~wherein said antibody or antibody derivative~~ that additionally comprises an artificial linker sequence.

12. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 1, wherein the variable region of said antibody or antibody derivative fragment comprises amino acids 1-122 and/or amino acids 138-249 as listed in SEQ ID NO:86.

13. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody derivative fragment according to claim 12, ~~wherein said antibody or antibody derivative~~ that additionally comprises an artificial linker sequence.

14. (currently amended) ~~A hybridoma~~ A hybridoma cell line secreting an antibody ~~or antibody derivative against factor IX/factor IXa~~ that binds Factor IX/Factor IXa and increases the procoagulant activity of Factor IXa according to claim 1.

15. (currently amended) ~~A hybridoma~~ The hybridoma cell line according to claim 14, ~~wherein said cell line~~ that is selected from the group consisting of cell lines having



ECACC deposit numbers 99090924, 99090925, 99090926, 99121614, 99121615, 99121616, 99121617, 99121618, 99121619 and 99121620.

16. (currently amended) An antibody ~~or antibody derivative which~~ that is secreted by a hybridoma cell line according to claim 14.

17. (cancelled)

18. (currently amended) A ~~pharmaceutical~~ preparation comprising an antibody or antibody derivative according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

19. (currently amended) ~~A preparation~~ The preparation according to claim 18, additionally comprising ~~factor~~ Factor IX $\alpha$  and/or ~~factor~~ Factor IX $\beta$ .

20-22. (cancelled)

23. (currently amended) A method of obtaining an antibody ~~or antibody derivative which~~ that ~~interacts with factor~~ binds Factor IX/~~factor~~ Factor IX $\alpha$  and increases the procoagulant activity of Factor IX $\alpha$ , comprising the steps of:

immunizing an immunocompetent mouse with an antigen selected from the group consisting of FIX, FIX $\alpha$ , FIX $\beta$  or fragments thereof,

isolating spleen cells of the immunized mouse,

producing hybridoma cells,

screening the hybridoma cell supernatants for an increase in the procoagulant activity of Factor IX $\alpha$ , isolating and purifying the antibodies or antibody derivatives from hybridoma cell supernatants which exhibit an increase in the procoagulant activity of ~~factor~~ Factor IX $\alpha$ .

24-25. (canceled)

26. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 4, ~~which~~ wherein the antibody fragment is a single chain antibody.

27. (currently amended) The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 4, ~~which~~ wherein the antibody is a humanized antibody.

28. (canceled)

29. (currently amended) ~~An~~ The antibody or antibody ~~derivative~~ fragment according to claim 2 wherein ~~said~~ the antibody is selected from the group consisting of an IgG, IgM, IgA and or IgE ~~antibodies~~ antibody.

30. (new) The antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the antibody fragment comprises a CDR3 peptide.

31. (new) The antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the antibody fragment is a CDR3 peptide.